

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**



\* 5 3 0 9 6 5 5 8 2 3 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**"LOCALIZACIÓN CELULAR Y DISTRIBUCIÓN EN  
TEJIDOS HUMANOS Y ANIMALES DE UN NUEVO  
ANTIGENO (ANTIGENO SA) ASOCIADO A LA ARTRITIS  
REUMATOIDE : DESARROLLO DE UNA TÉCNICA  
DIAGNÓSTICA ESPECÍFICA"**

**Margarita Rodríguez Mahou  
MADRID, 1996**

**21.159**

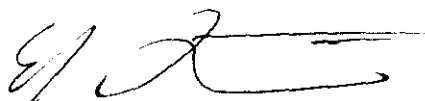
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**"LOCALIZACIÓN CELULAR Y DISTRIBUCIÓN EN  
TEJIDOS HUMANOS Y ANIMALES DE UN NUEVO  
ANTIGENO (ANTIGENO SA) ASOCIADO A LA ARTRITIS  
REUMATOIDE : DESARROLLO DE UNA TÉCNICA  
DIAGNÓSTICA ESPECÍFICA"**

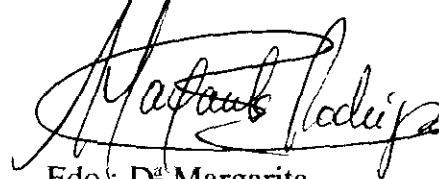
**TESIS DOCTORAL  
Margarita Rodríguez Mahou**

Vº Bº Director de Tesis



Fdo : Dr. D. Eduardo Fernández-Cruz  
Profesor Jefe del Servicio de Inmunología  
del H.G.U. "Gregorio Marañón"

Doctorando



Fdo : Dª Margarita  
Rodríguez Mahou

D. Eduardo Fernández-Cruz Pérez, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA : Que D<sup>a</sup> Margarita Rodriguez Mahou ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado : "LOCALIZACION CELULAR Y DISTRIBUCION EN TEJIDOS HUMANOS Y ANIMALES DE UN NUEVO ANTIGENO (ANTIGENO SA) ASOCIADO A LA ARTRITIS REUMATOIDE: DESARROLLO DE UNA TECNICA DIAGNOSTICA ESPECIFICA"

Y para que así conste donde proceda, firma la presente en Madrid a 24 de Junio de 1996



**A mis padres**

**A mis hijos**

## AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor Eduardo Fernández-Cruz, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", director de este trabajo.
- Al Dr. Agustín Zapata González, Director del Departamento de Biología Celular, tutor de este trabajo.
- Al Dr. Francisco Javier López-Longo, por su incondicional ayuda y su calidad científica y humana.
- Al Dr. Luis Carreño Pérez, Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", por sus valiosos consejos y apoyo.
- Al Profesor Pedro García Barreno, Jefe de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, en cuyas instalaciones se ha realizado parte de este trabajo, por su ayuda científica.
- Al Profesor Jose Antonio Clavero Nuñez, Jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", por su gran ayuda en la consecución de parte del material biológico utilizado en este trabajo.
- A Martín Rubio Batllés, que me ayudó a dar mis primeros pasos con un ordenador, por su inestimable ayuda en el tratamiento informático de este trabajo y su apoyo diario.
- A Raquel Grau Simó, becaria del Servicio de Reumatología, por su importante colaboración en la realización de este trabajo.
- A la Dra. D<sup>a</sup> Milagrosa Escalona Monge, quien suministró el antígeno Sa purificado y ha sido durante varios años integrante del grupo de trabajo.
- A Elena Sánchez Sabaté, por su constante apoyo y afecto.

-A los facultativos adjuntos del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", por el interés que han prestado a la evolución de este trabajo.

-A los residentes y becarios del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", por su colaboración.

- A Jose López-Morchón, ATS del Servicio de Inmunología, quien durante muchos años ha colaborado conmigo en el trabajo diario y especialmente en este trabajo, consiguiendo, con su optimismo permanente, apoyarme en los momentos más difíciles.

-A todo el personal de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, que ha seguido con interés la realización de este trabajo.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN dc/ADN n : Acido DesoxirriboNucleico de doble cadena/nativo  
ADN sc : Acido DesoxirriboNucleico de simple cadena  
ADNsa : Desoxirribonucleasa  
ANA : Anticuerpos antinucleares (*AntiNuclear Antibodies*)  
AR : Artritis Reumatoide  
ARN : Acido RiboNucleico  
ARNsa : Ribonucleasa  
CDC : *Center for Disease Control*  
Chi<sup>2</sup> : Chi cuadrado ( $\chi^2$ )  
CIE : ContraInmunoElectroforesis  
CMH : Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
DMSO : Dimetilsulfóxido  
ELISA : Enzimoinmunoensayo (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)  
EMTC : Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo  
ENA : Antígenos nucleares extraíbles (*Extractable Nuclear Antigens*)  
FR : Factor Reumatoide  
IB : *ImmunoBlotting*  
IC95% : Intervalo de Confianza del 95%  
IFI : InmunoFluorescencia Indirecta  
HEp-2 : Células de línea tumoral epitelial humana (*Human Epythelial*)  
IgG : Inmunoglobulina G  
IgM : Inmunoglobulina M  
IL : Interleucina  
KD : KiloDalton; unidad de peso molecular; equivale a 1000 Daltons  
LES : Lupus Eritematoso Sistémico  
NK : Célula asesina natural (*Natural Killer*)  
nRNP : RiboNucleoProteína nuclear  
OR : Razón de predominio (*Odds Ratio*)  
PBS : Tampón salino fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)  
PMA : *Phorbol Myristate Acetate*  
PMSF : Fluoruro de metil fenil sulfonilo  
RANA : Antígeno nuclear de la artritis reumatoide (*Rheumatoid Arthritis Nuclear Antigen*)  
r.p.m. : revoluciones por minuto  
SD : Desviación estándar (*Standard Deviation*)  
SDS : Dodecilsulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulphate*)  
snRNP : Ribonucleoproteína nuclear de pequeño tamaño (*small nuclear RiboNucleoProtein*)  
SS : Síndrome de Sjögren  
TNF : Factor de necrosis tumoral (*Tumoral Necrosis Factor*)  
TSH : Hormona estimulante del tiroides (*Thyroid Stimulating Hormon*)

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
*Concepto de autoinmunidad	1
*Patogenia de las enfermedades autoinmunes	2
*Clasificación de las enfermedades autoinmunes	12
*Autoanticuerpos	15
Papel de los autoanticuerpos en la enfermedad autoinmune	15
Clasificación de los autoanticuerpos	18
*Artritis reumatoide	21
*Autoanticuerpos en la artritis reumatoide	24
Factor reumatoide	24
Anticuerpos antinucleares (ANA)	26
Anticuerpos anti-histonas	27
Anticuerpos anti-ADN	28
Anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles	29
Anti-Sm y Anti-nRNP	29
Anti-Ro / SSA	31
Anti-La / SSB	33
Anticuerpos anticitoesqueleto	34
Anticuerpos anticitoplasmáticos	35
Anticuerpos anti-RANA (Rheumatoid Arthritis Nuclear Antigen)	36
Anticuerpos anti-RA33	36
Otros anticuerpos	37
*Diagnóstico serológico de AR	37
*Anticuerpos anti-Sa	38
<b>JUSTIFICACION</b>	<b>41</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>43</b>
<b>1. Técnicas empleadas</b>	<b>43</b>
1.1 Técnica de inmunofluorescencia indirecta	44
1.1.1. Procedimiento general	44
1.1.2. Preparación de sustratos para técnica de IFI	45
1.1.2.1. Hígado, riñón y estómago de rata	45
1.1.2.2. Línea celular HEP-2	45
1.1.2.3. Tejidos de mono	47
1.1.2.4. Neutrófilos humanos	47
1.1.2.5. Hígado y placenta humanos	48
1.1.2.6. Línea celular JAR	49
1.2. Técnica de contraelectroforesis	51
1.2.1. Procedimiento general	51
1.2.2. Preparación de extractos antigénicos para CIE	52
1.2.2.1. Extracto de timo de conejo	52
1.2.2.2. Extracto de placenta humana	52
1.3. Técnica de ensayo de inmunoenzima	54
1.4. Técnica de "inmunoblotting"	55
1.4.1. Procedimiento general	55
1.4.2. Preparación de extractos para técnica de IB	57
1.4.2.1. Extracto de timo de conejo	57
1.4.2.2. Extracto de placenta humana	57
1.4.2.3. Mitocondrias de hígado de rata	57
1.4.2.4. Fracciones celulares de placenta humana	58



1.5. Ensayos de adsorción	61
1.5.1. Adsorción con antígeno Sa purificado	61
1.5.2. Adsorción con fracción de mitocondrias de placenta humana	61
1.5.3. Adsorción con subfracciones mitocondriales	62
1.5.3.1. Obtención de subfracciones mitocondriales	62
1.5.3.2. Procedimientos de adsorción	66
<b>2. Muestras estudiadas</b>	<b>68</b>
2.1. Sueros de pacientes con AR	68
•Distribución de los 94 pacientes diagnosticados de AR por grupos de edad	68
•Distribución de los 94 pacientes diagnosticados de AR por tiempo de evolución de la enfermedad	69
•Manifestaciones extraarticulares en 94 pacientes con AR	69
•Criterios para el estadiaje de la afección articular de pacientes con AR	70
•Criterios para el clasificación del estadio funcional en pacientes con AR	71
•Estadios radiológicos articulares y funcionales de los 94 pacientes con AR	72
2.2. Sueros de referencia y controles	72
<b>3. Análisis estadístico</b>	<b>73</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>74</b>
<b>1. Resultados obtenidos con las diferentes técnicas de estudio de autoanticuerpos</b>	<b>74</b>
1.1. Resultados obtenidos con técnica de IFI	74
1.1.1. IFI sobre hígado, riñón y estomago de rata	74
•Patrones de fluorescencia encontrados por IFI sobre tejidos de rata en 94 pacientes con AR	74
1.1.2. IFI sobre sustrato de células tumorales HEp-2	75
•Patrones de inmunofluorescencia mediante IFI sobre células HEp-2 en 94 pacientes con AR	75
•Títulos de anticuerpos antinucleares detectados sobre células HEp-2 en 94 pacientes con AR	77
1.1.3. IFI sobre tejidos de mono	77
1.1.4. IFI sobre neutrófilos humanos	78
1.1.5. IFI sobre hígado humano	78
1.1.6. IFI sobre placenta humana	78
1.1.7. IFI sobre sustrato de celulas tumorales JAR	79
1.2. Resultados obtenidos con técnica de CIE	81
1.3. Resultados obtenidos con técnica de "inmunoblotting"	81
1.3.1. Detección de anti-Sa mediante técnica de IB con extracto de placenta humana	81
1.3.2. Otros autoanticuerpos detectados mediante técnica de "inmunoblotting"	83
•Resultados obtenidos mediante técnica de "inmunoblotting" en 94 pacientes con AR	83
1.4. Resultados obtenidos con técnica de enzimoimmunoensayo	84
<b>2. Estudio de las correlaciones entre los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas de determinación de autoanticuerpos y el "inmunoblotting" como técnica de referencia</b>	<b>85</b>
2.1. Técnica de inmunofluorescencia indirecta	85
2.1.1. Tejidos de rata	85
2.1.2. Células tumorales HEp-2	85

•Relación entre patrones de inmunofluorescencia sobre células HEp-2 y anti-Sa detectado por "inmunoblotting" en 94 pacientes con AR	86
•Relación entre títulos de anticuerpos antinucleares por IFI sobre células HEp-2 y anti-Sa detectado por "inmunoblotting" en 94 pacientes con AR	87
2.1.3. Sustrato de neutrófilos humanos	87
2.1.4. Sustrato de placenta humana	88
•Anti-Sa detectado mediante "inmunoblotting" y correlación con patrón anular sincitial por IFI sobre sustrato de placenta humana en 94 pacientes con AR	88
2.2. Técnica de contrainmunolectroforesis	89
2.3. Técnica de enzimonunoensayo	89
•Anticuerpos anti-Sa detectados mediante "inmunoblotting" en relación a anticuerpos anti-histonas y anti-ADN nativo detectados mediante enzimonunoensayo en 94 pacientes con AR	90
2.4. Determinación de factor reumatoide mediante nefelometría	90
•Anticuerpos anti-Sa detectados mediante "inmunoblotting" y factor reumatoide detectado por nefelometría en 94 pacientes con AR	91
<b>3. Estudio de las correlaciones entre los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas de determinación de autoanticuerpos y el patrón anular sincitial detectado mediante IFI sobre placenta humana</b>	<b>92</b>
3.1. Técnica de inmunofluorescencia indirecta	92
3.1.1. Tejidos de rata	92
3.1.2. Células tumorales HEp-2	92
•Relación entre patrones de inmunofluorescencia sobre células HEp-2 y patrón anular sincitial detectado por IFI sobre sustrato de placenta humana en 94 pacientes con AR	93
•Relación entre títulos de anticuerpos antinucleares por IFI sobre células HEp-2 y patrón anular sincitial detectado por IFI sobre sustrato de placenta humana en 94 pacientes con AR	94
3.1.3. Neutrófilos humanos	94
3.2. Técnica de contrainmunolectroforesis	95
3.3. Técnica de enzimonunoensayo	95
•Patrón anular sincitial detectado mediante IFI sobre sustrato de placenta humana en relación a anticuerpos anti-histonas y anti-ADN nativo detectados mediante ELISA en 94 pacientes con AR	96
3.4. Determinación de factor reumatoide mediante nefelometría	96
•Relación entre patrón anular sincitial detectado por IFI sobre sustrato de placenta humana y factor reumatoide detectado por nefelometría en 94 pacientes con AR	97
<b>4. Coincidencias y discrepancias de la técnica de IFI y la técnica de "inmunoblotting" para la detección de anticuerpos anti-Sa, en relación a resultados de las técnicas de detección de autoanticuerpos</b>	<b>98</b>
•Cuadro comparativo de las asociaciones halladas entre anticuerpos anti-Sa detectados por IB o por IFI sobre placenta humana y la presencia de autoanticuerpos en 94 pacientes con AR	99
<b>5. Estudio de las correlaciones existentes entre presencia de parámetros clínicos y presencia de anticuerpos anti-Sa detectados mediante "inmunoblotting" o IFI sobre placenta humana</b>	<b>100</b>
5.1. "Inmunoblotting"	100
•Anticuerpos anti-Sa detectados mediante "inmunoblotting" y estadios radiológicos y funcionales en 94 pacientes con AR	101
•Anticuerpos anti-Sa detectados mediante "inmunoblotting" y manifestaciones extraarticulares en 94 pacientes con AR	102

5.2. IFI sobre sustrato de placenta humana	102
•Relación entre patrón anular sincitial detectado por IFI sobre sustrato de placenta humana y estadios radiológicos y funcionales en 94 pacientes con AR	103
•Relación entre patrón anular sincitial detectado por IFI sobre sustrato de placenta humana y manifestaciones extraarticulares en 94 pacientes con AR	104
<b>6. Coincidencias y discrepancias de la técnica de "immunoblotting" para la detección de anticuerpos anti-Sa y el patrón anular sincitial detectado por IFI, en relación a características clínicas de los pacientes</b>	<b>105</b>
•Cuadro comparativo de las asociaciones halladas entre anti-Sa detectado por IB o patrón anular sincitial detectado por IFI sobre placenta humana y las características clínicas de los 94 pacientes con AR	106
<b>7. Evaluación de la técnica de IFI sobre placenta humana para la detección de anticuerpos anti-Sa : titulación de los anticuerpos y ensayo de adsorción con antígeno Sa purificado</b>	<b>107</b>
•Titulación de anticuerpos con patrón anular sincitial por IFI sobre sustrato de placenta humana en pacientes con AR	107
<b>8. Localización celular y subcelular del antígeno Sa</b>	<b>110</b>
8.1. Localización a nivel celular	110
8.1.1. "Immunoblotting" con extracto de mitocondrias de placenta humana	110
8.1.2. "Immunoblotting" con extracto de mitocondrias de hígado de rata	112
8.1.3. Adsorción de sueros con anticuerpos anti-Sa con extracto completo de mitocondrias de placenta humana y posterior análisis mediante IFI	112
8.2. Localización a nivel subcelular	113
8.2.1. Adsorción de sueros con anticuerpos anti-Sa con las diferentes subfracciones mitocondriales y posterior análisis mediante IFI	113
<b>DISCUSION</b>	<b>115</b>
•Algoritmo sugerido para el diagnóstico precoz de AR	126
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>129</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

**ADN dc/ADN n** : Acido DesoxirriboNucleico de doble cadena/nativo  
**ADN sc** : Acido DesoxirriboNucleico de simple cadena  
**ADNsa** : Desoxirribonucleasa  
**ANA** : Anticuerpos antinucleares (*AntiNuclear Antibodies*)  
**AR** : Artritis Reumatoide  
**ARN** : Acido RiboNucleico  
**ARNsa** : Ribonucleasa  
**CDC** : *Center for Disease Control*  
**Chi<sup>2</sup>** : Chi cuadrado ( $\chi^2$ )  
**CIE** : ContraInmunoElectroforesis  
**CMH** : Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
**DMSO** : Dimetilsulfóxido  
**ELISA** : EnzimoInmunoensayo (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)  
**EMTC** : Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo  
**ENA** : Antígenos nucleares extraíbles (*Extractable Nuclear Antigens*)  
**FR** : Factor Reumatoide  
**IB** : *ImmunoBlotting*  
**IC95 %** : Intervalo de Confianza del 95 %  
**IFI** : InmunoFluorescencia Indirecta  
**HEp-2** : Células de línea tumoral epitelial humana (*Human Epythelial*)  
**IgG** : Inmunoglobulina G  
**IgM** : Inmunoglobulina M  
**IL** : Interleucina  
**KD** : KiloDalton; unidad de peso molecular; equivale a 1000 Daltons  
**LES** : Lupus Eritematoso Sistémico  
**NK** : Célula asesina natural (*Natural Killer*)  
**nRNP** : RiboNucleoProteína nuclear  
**OR** : Razón de predominio (*Odds Ratio*)  
**PBS** : Tampón salino fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)  
**PMA** : *Phorbol Myristate Acetate*  
**PMSF** : Fluoruro de metil fenil sulfonilo  
**RANA** : Antígeno nuclear de la artritis reumatoide (*Rheumatoid Arthritis Nuclear Antigen*)  
**r.p.m.** : revoluciones por minuto  
**SD** : Desviación estándar (*Standard Deviation*)  
**SDS** : Dodecilsulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulphate*)  
**snRNP** : Ribonucleoproteína nuclear de pequeño tamaño (*small nuclear RiboNucleoProtein*)  
**SS** : Síndrome de Sjögren  
**TNF** : Factor de necrosis tumoral (*Tumoral Necrosis Factor*)  
**TSH** : Hormona estimulante del tiroides (*Thyroid Stimulating Hormon*)

## INTRODUCCION

### CONCEPTO DE AUTOINMUNIDAD

La función esencial del sistema inmune es la protección del organismo mediante la eliminación o destrucción de los antígenos extraños ("no-propios"). Por tanto, la distinción entre antígenos "propios" y "no-propios" es fundamental para el sistema inmune. Una "tolerancia inmune" excesiva ante antígenos extraños crearía un estado virtual de inmunodeficiencia, mientras que una "tolerancia inmune" defectuosa podría conducir al desarrollo de una reacción autoinmune patológica y, eventualmente, a una enfermedad autoinmune.

El mecanismo por el cual se produce el grado adecuado de tolerancia inmune es poco conocido. La "Teoría de la Selección Clonal" (1) propuso que los linfocitos con potencial de atacar antígenos propios eran eliminados durante el desarrollo del sistema inmune. Algunos clones autorreactivos "prohibidos" podrían escapar a este mecanismo de selección originando las enfermedades autoinmunes. Aunque la posibilidad de eliminación de los clones autorreactivos ha sido probada experimentalmente (2), se pueden hallar estos clones en personas sanas con una frecuencia superior a la esperada (3,4), sugiriendo que este mecanismo no es suficiente para explicar el fenómeno de tolerancia inmunológica.

Parece ser que, aunque los clones autorreactivos existen en personas sanas, se hallan bajo un estrecho control por el sistema inmune,

probablemente por parte de linfocitos T específicos que reconocen las células efectoras autoinmunes. Por otra parte, hay pruebas de la función fisiológica de ciertas reacciones autoinmunes, probablemente con la finalidad de eliminar los autoantígenos liberados por la muerte celular (5) o intervenir en la regulación del sistema inmune a través de la red idiotípica. Estas reacciones y los mecanismos que las regulan son poco conocidas, y se ignora la causa por la que, en determinadas circunstancias, pueden inducir una enfermedad autoinmune.

La autoinmunidad, en resumen, es consecuencia del fallo o ruptura de los mecanismos fisiológicos responsables de mantener la tolerancia a lo propio. Sin embargo, los fenómenos autoinmunes sólo se convierten en enfermedad autoinmune cuando no están dirigidos a cumplir un papel fisiológico en el organismo.

## **PATOGENIA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

Las enfermedades autoinmunes son variables en su expresión clínica y pronóstico, pero presentan rasgos patogénicos comunes. Las diferencias parecen relacionarse con la naturaleza del autoantígeno implicado, los patrones de migración leucocitaria y los mecanismos reguladores inmunológicos, incluyendo citocinas, autoanticuerpos y células T citotóxicas. La figura 1 esquematiza la respuesta autoinmune y los posibles mecanismos inductores y efectores de autoinmunidad. En general, se requieren al menos tres condiciones previas : la persistencia de linfocitos T y B autorreactivos, la accesibilidad del sistema inmune al autoantígeno, y el procesamiento y presentación del autoantígeno por una

célula presentadora de antígeno, lo cual se realiza, en conjunción con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, ante los linfocitos T "helper".

En conjunto, los mecanismos inductores de autoinmunidad pueden clasificarse en tres grandes grupos :

- a) relacionados con peculiaridades del autoantígeno.
- b) relacionados con las células presentadoras de antígeno.
- c) relacionados con los mecanismos inmunorreguladores.

Dentro del primer grupo, se comentarán a continuación los principales mecanismos :

1) Un autoantígeno que normalmente no entra en contacto con el sistema inmune puede, caso de hacerlo, originar una respuesta autoinmune, dado que no ha podido producirse previamente el proceso de tolerancia inmune. Así, los antígenos del esperma, habitualmente separados de los mecanismos inmunes, pueden inducir la aparición de autoanticuerpos cuando entran en contacto con el sistema inmune, por ejemplo tras una vasectomía (6). Actualmente se cree que estos autoanticuerpos no generan enfermedad autoinmune franca en el ser humano.

2) El mecanismo inductor de autoinmunidad denominado "mimetismo molecular" supone que un autoantígeno y un antígeno exógeno, como el de un microorganismo infeccioso, pueden compartir determinantes antigénicos, lo que convierte la respuesta inmune normal contra el microorganismo en una respuesta autoinmune. Un ejemplo

clásico es el de la fiebre reumática, en la que se supone el mimetismo molecular entre un antígeno del estreptococo beta-hemolítico y la miosina del músculo cardíaco (7). En este mecanismo, es crucial la similitud entre el antígeno propio y el no-propio, lo suficiente para generar inmunidad cruzada, pero sin que exista una identidad absoluta entre ambos, ya que ello podría generar un mecanismo de tolerancia inmune. Asimismo, el mantenimiento de la respuesta autoinmune requiere un reforzamiento de la misma por parte del autoantígeno, perpetuando así la reacción inmune. En general, este mecanismo es difícil de reproducir experimentalmente, por lo que muchos supuestos de mimetismo molecular han sido, probablemente, sobreestimados.

3) La alteración molecular de un autoantígeno, ante el cual existía tolerancia inmune, puede desencadenar una reacción autoinmune. Si la alteración es provocada "in vitro", en algunas ocasiones los anticuerpos producidos contra el autoantígeno modificado pueden también reaccionar con el antígeno nativo "in vivo". En ciertas ocasiones, las modificaciones del autoantígeno pueden producirse directamente "in vivo", probablemente por la acción de fármacos, productos químicos e infecciones. Este sería el posible mecanismo inductor de la miocarditis desencadenada por la infección con el virus Coxsackie B3 en ratones (8), en la que algunos autores han propuesto que la infección viral altera las características de la miosina cardíaca, generando una reacción autoinmune (9).

4) Determinados autoantígenos a los que se adicionan grupos hapténicos de origen exógeno, podrían convertirse en diana de una reacción autoinmune tras ser sometidos a dicha modificación. Este



mecanismo permitiría explicar ciertas reacciones autoinmunes provocadas por fármacos, como por ejemplo, el desarrollo de anemia hemolítica autoinmune dirigida contra antígenos del sistema Rh después de la administración de alfa-metildopa (10).

5) En ciertas ocasiones, algunos anticuerpos anti-idiotipo podrían, accidentalmente, reproducir la configuración de un autoantígeno, contra el cual desencadenarían una respuesta autoinmune. Este mecanismo ("de imagen interna") ha sido propuesto en un ejemplo de miastenia gravis experimental en conejos (11).

6) En el contexto de enfermedades neoplásicas, ciertos antígenos tumorales podrían compartir epítomos que simularían los presentes en determinados autoantígenos, generando así una respuesta autoinmune, habitualmente denominada paraneoplásica. Este mecanismo se ha propuesto en tumores ováricos asociados a degeneración cerebelosa con presencia de anticuerpos contra las células de Purkinje (12). También se ha descrito la aparición de autoanticuerpos acantolíticos y pénfigo paraneoplásico en asociación a diferentes tipos de tumores (13).

En el segundo grupo de mecanismos inductores de autoinmunidad se incluyen determinadas alteraciones de las células presentadoras de antígeno. Distinguimos dos mecanismos principales :

1) La expresión aberrante de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) por células componentes de un tejido, conjuntamente con un autoantígeno constituyente de la célula, podría iniciar una respuesta autoinmune contra el tejido. Este es el mecanismo

propuesto para la diabetes insulín-dependiente, en la cual las células de los islotes pancreáticos exhiben dicha expresión aberrante (14). Aunque este mecanismo ha sido sugerido en otros contextos de enfermedad autoinmune, experimentalmente, sin embargo, no han podido inducirse reacciones autoinmunes incrementando la expresión de moléculas de clase II del CMH por parte de los tejidos diana.

2) Las infecciones virales, capaces de provocar la secreción de interferón gamma, pueden, a través de esta citocina, incrementar la expresión de moléculas de clase II del CMH, induciendo una respuesta autoinmune contra determinados tejidos de una forma similar a la descrita en el anterior apartado. Asimismo, también podría incrementar la expresión de moléculas de clase I del CMH, induciendo un daño citotóxico tisular mediado por linfocitos T CD8+. Tampoco hay evidencia experimental sobre este posible mecanismo inductor de autoinmunidad.

El tercer y último grupo de mecanismos inductores de autoinmunidad conlleva la alteración de los sistemas inmunorreguladores. Dentro de este grupo distinguimos los siguientes mecanismos :

1) El fallo en la delección clonal completa de ciertos clones autorreactivos podría explicar la posibilidad de reacciones autoinmunes en determinados individuos, aunque probablemente son necesarias otras alteraciones inmunorreguladoras para desencadenar la autoinmunidad.

2) Existe evidencia experimental de que ciertos clones de linfocitos T supresores pueden "proteger" a los animales de experimentación contra mecanismos exógenos capaces de inducir respuestas autoinmunes. Esta

protección en transferible a otros animales mediante células esplénicas del animal protegido, y específicamente a través de una línea de células T supresoras (15,16). Asimismo, cepas de ratones con alta susceptibilidad a la generación de respuestas autoinmunes, son deficitarios en la producción de células supresoras específicas de antígeno, y esta producción se reduce progresivamente en los animales más viejos, lo cual se correlaciona con la mayor predisposición de estos animales al desarrollo de enfermedades autoinmunes (17). Aunque no se han encontrado evidencias similares en humanos, se ha postulado que una reducción de los linfocitos T supresores antígeno-específicos podría inducir reacciones autoinmunes en determinados contextos clínicos como la artritis reumatoide (AR) o la tiroiditis de Hashimoto (18,19).

3) Dentro de la dotación normal de linfocitos B del organismo, es muy probable que existan células B autorreactivas, y por tanto con potencialidad para producir autoanticuerpos. De esta forma, una activación policlonal de los linfocitos B generaría numerosos anticuerpos autorreactivos. Un ejemplo clásico de este mecanismo de activación policlonal sería el lupus eritematoso sistémico (LES). Esta teoría, sin embargo, no explica la especificidad concreta de los autoanticuerpos encontrados, ya que, incluso en una enfermedad como el LES, en la que se encuentra un amplio espectro de autoanticuerpos, no se encuentran habitualmente anticuerpos organoespecíficos, y, dentro de los no-organoespecíficos, es característica la presencia de determinados tipos de autoanticuerpos y la ausencia de otros. El mecanismo de activación policlonal B se ha invocado igualmente para explicar la patogenia de la enfermedad injerto-contra-huésped, pero también en este contexto se producen únicamente determinados autoanticuerpos. La presencia de un

autoantígeno, a elevadas concentraciones, en el momento de producirse los fenómenos injerto-contra-huésped, puede favorecer la producción de autoanticuerpos específicos contra dicho antígeno (20).

4) Puede demostrarse la existencia de anticuerpos antiidiotipo, dirigidos contra epítomos de la región Fab de las inmunoglobulinas y los receptores de los linfocitos B. Se ha postulado que dichos anticuerpos tienen una función reguladora del sistema inmune, estando interrelacionados por lo que se ha denominado "red idiotípica". Las respuestas antiidiotipo se han demostrado en el contexto de diversas enfermedades autoinmunes, lo que ha llevado a postular que la autoinmunidad podría ser desencadenada por una alteración de los mecanismos de regulación de la red idiotípica.

5) De igual forma que, tras el proceso de delección clonal, podrían persistir clones de linfocitos B autorreactivos, se postula la presencia de clones T autorreactivos, los cuales, en condiciones normales, no desencadenarían respuestas autoinmunes contra los correspondientes antígenos diana. En situaciones patológicas, esta tolerancia de células T podría ser alterada, iniciando la enfermedad autoinmune.

Una vez iniciada la respuesta autoinmune se ponen en marcha tres grupos principales de mecanismos efectores :

- a) linfocitos B y producción de autoanticuerpos
- b) linfocitos T CD4+ y producción de linfocinas
- c) linfocitos T CD8+ citotóxicos

La respuesta inmune mediada por linfocitos B se desencadena a partir de determinadas interleucinas (IL-4, IL-5 e IL-6) secretadas por los linfocitos T CD4+, que inducen la proliferación y diferenciación de las células B. Como consecuencia, se produce la síntesis de autoanticuerpos de clase IgG. Los autoanticuerpos pueden inducir daño tisular por diversos mecanismos, dentro de los cuales se encuentran :

1) La opsonización de células circulantes y su posterior destrucción por el sistema mononuclear fagocítico (por ejemplo, opsonización de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, generando anemias hemolíticas, neutropenias y trombopenias autoinmunes).

2) La destrucción celular producida por activación de la cascada del complemento (por ejemplo, en las anemias hemolíticas autoinmunes).

3) La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (por ejemplo en determinadas tiroiditis (19)).

4) La formación de inmunocomplejos, bien a nivel local, bien circulantes, con posterior depósito en determinados órganos. En ambos casos, los inmunocomplejos pueden activar la cascada del complemento y atraer leucocitos directamente responsables del daño tisular (por ejemplo, las lesiones renales del LES (21)).

5) Los autoanticuerpos producidos pueden tener asimismo efecto inhibitor o estimulante sobre determinados receptores de la superficie celular. Así, los anticuerpos contra el receptor de acetilcolina en la miastenia gravis, generan una alteración funcional por bloqueo del

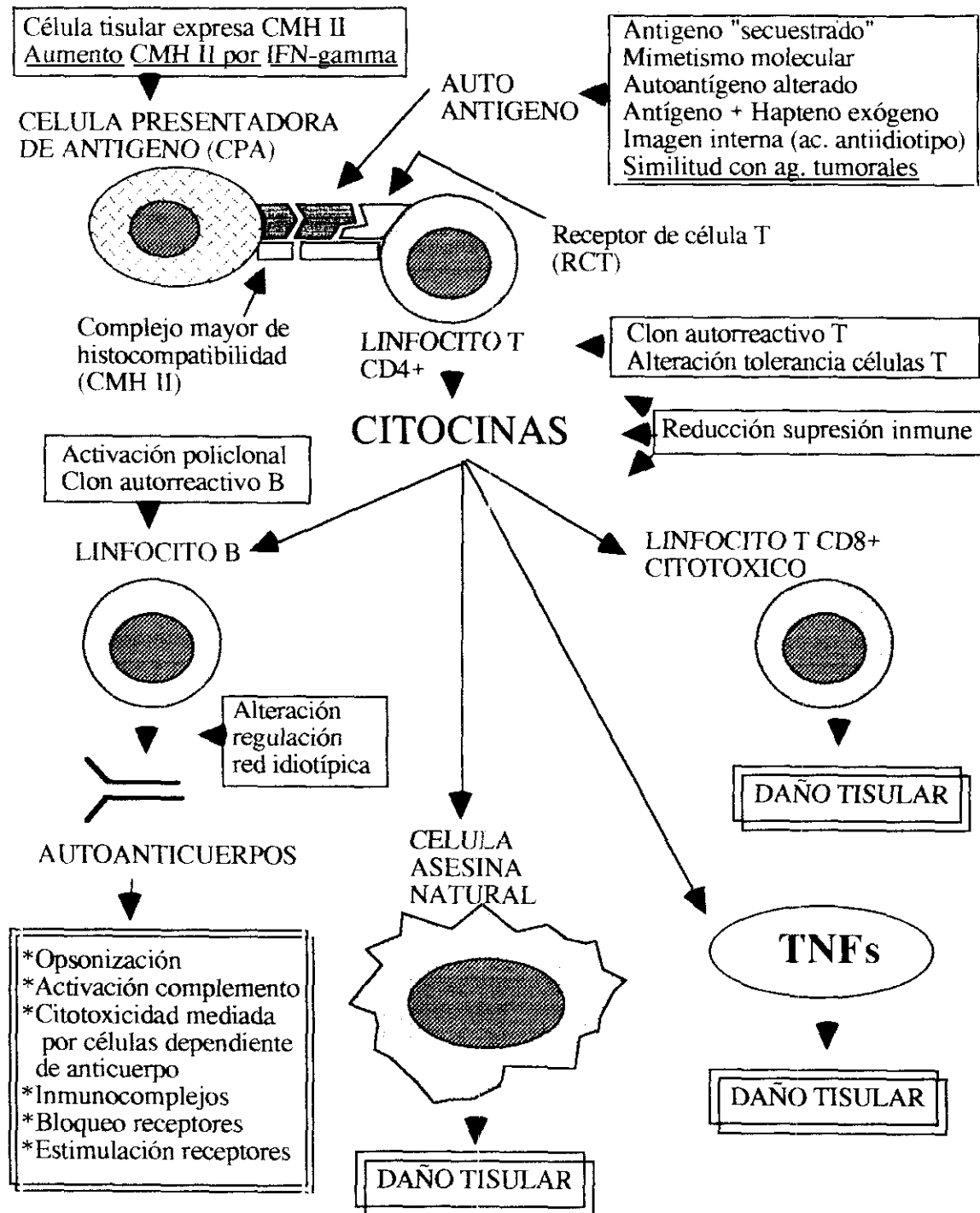
receptor (22). En cambio, los anticuerpos contra el receptor de la TSH en la enfermedad de Graves, tienen una capacidad estimulante del receptor, pudiendo mimetizar la acción de la hormona (23).

Los mecanismos efectores relacionados con los linfocitos T CD4+ son mediados principalmente por citocinas. En determinados casos, el efecto de las linfocinas es directamente lesivo para las células del tejido, como es el caso de los factores de necrosis tumoral (TNFs). En otros casos, las interleucinas atraen y estimulan la actividad de otras células efectoras, como ocurre con el interferón gamma y su efecto sobre la actividad de las células asesinas naturales ("natural killer", NK) y su capacidad de aumentar la expresión de moléculas de clase II del CMH, generando la presencia de un mayor número de linfocitos CD4+.

Finalmente, los mecanismos efectores mediados por linfocitos CD8+, son generados por la capacidad de citotoxicidad directa de estas células, actividad regulada por la expresión de moléculas de clase I del CMH en las células diana. Experimentalmente, los linfocitos CD8+ citotóxicos pueden reproducir las lesiones en determinadas enfermedades autoinmunes (24,25).

En definitiva, actualmente se piensa que la mayor parte de las enfermedades autoinmunes son producidas por una combinación de los tres grupos de mecanismos efectores, puesto que en muchas de ellas hay evidencia experimental relacionada con varios mecanismos de daño tisular.

**Figura 1. Mecanismos patogénicos y sistemas efectores en las enfermedades autoinmunes**



## CLASIFICACION DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Tradicionalmente, las enfermedades autoinmunes se han clasificado en dos grandes grupos, según sean sistémicas (no organoespecíficas), o estén dirigidas contra un determinado órgano (organoespecíficas). Debido al aparente solapamiento entre estos dos grupos, se ha señalado que es más conveniente hablar de "espectro" (26). Paradójicamente, en algunas enfermedades, a pesar de que el antígeno diana de la reacción autoinmune se distribuye ampliamente por el organismo, la enfermedad se circunscribe a un sólo órgano o tejido, o afecta de forma limitada a cierto conjunto de órganos (27). Una clasificación operativa de las enfermedades autoinmunes (tabla I) debería incluir, por tanto, los siguientes grupos :

a) *Enfermedades autoinmunes organoespecíficas*, en las que las alteraciones se concentran primariamente sobre un único órgano, tejido, tipo celular o uno de sus productos, quedando restringidas las manifestaciones clínicas al órgano, tejido o célula afectados. Los autoanticuerpos que aparecen en este grupo de enfermedades son denominados organoespecíficos, y algunos intervienen de forma clara en la patogenia de la enfermedad.

b) *Enfermedades autoinmunes organoespecíficas "paradójicas"*, en las que existe un autoantígeno distribuido de forma sistémica, y uno o varios autoanticuerpos no organoespecíficos, pero la enfermedad se localiza principalmente en determinados tejidos u órganos. El autoanticuerpo "marcador" no tiene relación evidente con la patogenia de la enfermedad, y el significado de su presencia aún no ha sido resuelto.



c) Enfermedades autoinmunes multisistémicas o no organoespecíficas, en las que se detectan múltiples anticuerpos dirigidos contra autoantígenos intracelulares o de la superficie celular, ampliamente distribuidos por el organismo. Las implicaciones fisiopatológicas son atribuidas principalmente al depósito sistémico de inmunocomplejos, y, posiblemente, a los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie de las células sanguíneas o del endotelio vascular.

Las enfermedades autoinmunes relacionadas con el tejido conectivo estarían encuadradas, según esta clasificación, en los dos últimos grupos. Dentro del grupo de enfermedades organoespecíficas "paradójicas", incluiríamos al síndrome de Sjögren (SS) y al complejo polimiositis / dermatomiositis. En estas enfermedades, pese a aparecer anticuerpos no-organoespecíficos, las manifestaciones clínicas se limitan a un conjunto restringido de órganos. En el grupo de enfermedades autoinmunes reumáticas sistémicas o no organoespecíficas, se incluirían las siguientes : LES, AR, enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y esclerodermia, así como los síndromes de solapamiento ("overlap"). En todas estas enfermedades existe una afección de múltiples órganos y aparecen frecuentemente autoanticuerpos no-organoespecíficos, dirigidos contra antígenos nucleares (ANA) de diferentes especificidades. Algunos de estos autoanticuerpos son específicos o marcadores de enfermedad.

**TABLA I. Clasificación de las enfermedades autoinmunes.**

<p><b>A) ENFERMEDADES AUTOINMUNES ORGANOESPECIFICAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Enfermedad de Addison</li> <li>-Gastritis crónica atrófica / Anemia perniciosa</li> <li>-Tiroiditis de Hashimoto</li> <li>-Anemia hemolítica autoinmune</li> <li>-Neutropenia autoinmune</li> <li>-Trombopenia autoinmune</li> <li>-Aplasia pura de serie roja</li> <li>-Enfermedad de Graves</li> <li>-Vitíligo</li> <li>-Diabetes insulín-resistente</li> <li>-Diabetes mellitus tipo I</li> <li>-Esclerosis múltiple</li> <li>-Miastenia gravis</li> </ul>
<p><b>B) ENFERMEDADES AUTOINMUNES ORGANOESPECIFICAS "PARADOJICAS"</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Síndrome de Sjögren</li> <li>-Polimiositis / Dermatomiositis</li> <li>-Síndrome de Goodpasture</li> <li>-Cirrosis biliar primaria</li> <li>-Vasculitis sistémicas necrotizantes</li> <li>-Hepatitis crónica activa autoinmune</li> <li>-Pénfigo y enfermedades bullosas cutáneas autoinmunes</li> </ul>
<p><b>C) ENFERMEDADES AUTOINMUNES MULTISISTEMICAS O NO ORGANOESPECIFICAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Lupus eritematoso sistémico</li> <li>-Esclerodermia</li> <li>-Enfermedad mixta del tejido conectivo</li> <li>-Artritis reumatoide</li> <li>-Síndromes de solapamiento ("overlap")</li> </ul>

## **AUTOANTICUERPOS**

### **PAPEL DE LOS AUTOANTICUERPOS EN LA ENFERMEDAD AUTOINMUNE**

Al evaluar la presencia de un autoanticuerpo en el contexto clínico de una enfermedad de origen presuntamente autoinmune, deben tenerse en cuenta tres posibles mecanismos:

a) *La enfermedad tiene una patogenia autoinmune y por tanto los autoanticuerpos son directamente responsables de las lesiones histológicas, signos y síntomas de la enfermedad, a través de mecanismos de base inmunológica (por ejemplo, las anemias hemolíticas autoinmunes).*

b) *La enfermedad tiene su origen en otro agente etiológico, el cual, produciendo el daño tisular, induce la aparición de los autoanticuerpos, los cuales no tienen papel patogénico por sí mismos, constituyendo un epifenómeno (por ejemplo, los anticuerpos anti-LKM 2 en la hepatitis inducida por fármacos).*

c) *Un agente etiológico induce de forma independiente el desarrollo de la enfermedad y los fenómenos autoinmunes (por ejemplo, la aparición de anticuerpos anti-LKM 1 en la infección crónica por virus C).*

Para probar la primera hipótesis, es decir, el origen autoinmune de la enfermedad, debe contarse con una o más de las siguientes evidencias experimentales :

1) La inducción deliberada de autoinmunidad en un animal de experimentación debe reproducir las lesiones características de la enfermedad. Ejemplos clásicos son la tiroiditis experimental inducida por tiroglobulina o la encefalomiелitis alérgica experimental inducida por proteína básica de la mielina. En ambos casos, la utilización de un autoantígeno específico induce la aparición de una enfermedad autoinmune organoespecífica, desarrollándose lesiones histológicas similares a las de su contrapartida en el ser humano.

2) La alteración deliberada del sistema inmune del animal de experimentación puede evitar el desarrollo de una enfermedad autoinmune, en base a la intervención sobre los mecanismos efectores supuestamente implicados. De ese modo, el desarrollo de enfermedades autoinmunes espontáneas en animales genéticamente predispuestos para su desarrollo, puede quedar modificado por la extirpación de la bursa de Fabricio o el timo, o por el tratamiento inmunosupresor, cuando se realiza antes del desarrollo completo del modelo experimental de la enfermedad.

3) En clínica humana, la transferencia de un autoanticuerpo, presente en el suero de un enfermo, a una persona sana, es capaz de inducir la aparición de signos y síntomas de la enfermedad autoinmune. Aunque estas evidencias están limitadas por consideraciones éticas, el clásico experimento de William Harrington realizado sobre si mismo (28), probó que el plasma de un paciente afecto de púrpura trombocitopénica autoinmune, transfundido a otro ser humano, genera en éste la enfermedad, demostrando el papel patogénico de los anticuerpos antiplaquetarios. Otro ejemplo basado en una evidencia de este tipo, es la

tirotoxicosis neonatal, inducida por anticuerpos contra el receptor de la TSH, los cuales, al pasar la barrera placentaria, inducen un estado transitorio de enfermedad de Graves en neonatos hijos de madres afectas (26).

4) La presencia de un autoanticuerpo es capaz de interferir con una función fisiológica medible. Así, la absorción de vitamina B<sub>12</sub> a nivel gástrico, mediada por factor intrínseco, puede ser bloqueada por la presencia del suero del paciente, en el cual se demuestra un autoanticuerpo contra el factor intrínseco.

En conjunto, aunque el número de autoanticuerpos descritos es considerable, la evidencia de su papel patogénico es muy limitada en la mayor parte de los casos.

## CLASIFICACION DE LOS AUTOANTICUERPOS

La tabla II muestra una clasificación de las diferentes especificidades de autoanticuerpos. Se distinguen tres grupos principales :

**a) Anticuerpos no organoespecíficos, no específicos de tejido.** Están dirigidos contra antígenos cuya localización fisiológica no se limita a un sólo órgano ni tampoco a un único tejido. Ejemplos típicos son los anticuerpos antinucleares (cuya clasificación se desglosa en la tabla III), los anticuerpos antimitocondria, y otros. Aparecen generalmente en enfermedades autoinmunes multisistémicas y también en enfermedades organoespecíficas "paradójicas".

**b) Anticuerpos no organoespecíficos, específicos de tejido.** Están dirigidos contra antígenos localizados en tejidos concretos, formando parte, sin embargo, de diversos órganos. Así, los anticuerpos antimúsculo liso son específicos de este tejido, pero pueden ser encontrados en algunas zonas pertenecientes a órganos diferentes, como la mucosa gastrointestinal, los espacios porta hepáticos, la zona peritubular renal, etc, no estando por tanto restringidos a un sólo órgano.

**c) Anticuerpos organoespecíficos.** Están dirigidos contra antígenos localizados en un sólo órgano, no siendo detectables en otros. Ejemplos típicos son los anticuerpos anti-tiroglobulina o los anticuerpos anti-microsomales tiroideos. En todos los casos, estos autoanticuerpos se manifiestan de forma preferente en enfermedades autoinmunes organoespecíficas.

<b>Tabla II. Clasificación de los autoanticuerpos</b>			
<b>A)</b>	<b>AUTOANTICUERPOS</b>	<b>NO</b>	<b>ORGANOESPECIFICOS, NO ESPECIFICOS DE TEJIDO</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Anticuerpos antinucleares               <ul style="list-style-type: none"> <li>-Anti-ENA (nRNP, Sm, Ro, La)</li> <li>-Anti-histonas</li> <li>-Anti-RA33, anti-RANA</li> <li>-Otros anticuerpos antinucleares</li> </ul> </li> <li>-Anticuerpos anti-mitocondria</li> <li>-Anticuerpos anti-microsomas hepatorreales</li> <li>-Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos</li> <li>-Anticuerpos anti-aparato de Golgi</li> <li>-Anticuerpos anti-ribosomales</li> <li>-Anticuerpos anti-Jol</li> <li>-Anticuerpos anti-lisomiales</li> <li>-Anticuerpos anti-cardiolipina</li> <li>-Anticuerpos anti-citoesqueleto (queratina, vimentina)</li> </ul>		
<b>B)</b>	<b>AUTOANTICUERPOS</b>	<b>NO</b>	<b>ORGANOESPECIFICOS, ESPECIFICOS DE TEJIDO</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Anticuerpos anti-músculo liso</li> <li>-Anticuerpos anti-músculo estriado</li> <li>-Anticuerpos anti-membrana basal glomerular</li> <li>-Anticuerpos anti-reticulina</li> <li>-Anticuerpos anti-sustancia intercelular</li> <li>-Anticuerpos anti-colágeno tipo II</li> </ul>		
<b>C)</b>	<b>AUTOANTICUERPOS</b>	<b>ORGANOESPECIFICOS</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Anticuerpos antiperoxidasa tiroidea</li> <li>-Anticuerpos antitiroglobulina</li> <li>-Anticuerpos anti-células parietales gástricas</li> <li>-Anticuerpos anti-factor intrínseco</li> <li>-Anticuerpos anti-cortex adrenal</li> <li>-Anticuerpos antieritrocitarios</li> <li>-Anticuerpos antiplaquetarios</li> <li>-Anticuerpos anti-neutrófilos</li> <li>-Anticuerpos anti-receptor de TSH</li> <li>-Anticuerpos anti-proteína básica de la mielina</li> <li>-Anticuerpos anti-melanocitos</li> <li>-Anticuerpos anti-células beta de los islotes pancreáticos</li> <li>-Anticuerpos anti-receptor de acetilcolina</li> </ul>		

Tabla III. Clasificación de los anticuerpos antinucleares

<b>Anticuerpos dirigidos contra membrana y matriz nuclear</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ac. antiláminas A/B/C (70KD/67KD/60KD)</li> <li>-Ac. antiporos nucleares (210KD)</li> <li>-Ac. antireceptor lámina B (61KD)</li> <li>-Ac. antimatriz nuclear</li> <li>-Ac. anti-A1 hnRNP</li> <li>-Ac. anti-A2 hnRNP / RA33 (33KD)</li> </ul>
<b>Anticuerpos dirigidos contra nucleosomas (proteínas asociadas a ADN)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ac. anti-ADN dc</li> <li>-Ac. anti-ADN sc</li> <li>-Ac. anti-histonas (H1-H2A-H2B-H3-H4)</li> <li>-Ac. anti-MMG y anti-LMG</li> <li>-Ac. anti-ADN topoisomerasa I (Sc170)</li> <li>-Ac. anticentrómero A/B/C (17KD/80KD/140KD)</li> <li>-Ac. anti-ADN topoisomerasa II</li> <li>-Ac. anti-Ku/Ki/SL (p70 y p80)</li> <li>-Ac. anti-PCNA / ciclina (34KD)</li> </ul>
<b>Anticuerpos dirigidos contra proteínas asociadas a ARN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ac. anti-U1 RNP 70KD/A/C (70KD/33KD/22KD)</li> <li>-Ac. anti-U2 RNP A'/B'' (31KD/25KD)</li> <li>-Ac. anti-Sm BB'/D (28KD/14KD)</li> <li>-Ac. anti-Ro/SSA (60KD/52KD)</li> <li>-Ac. anti-La/SSB (50 KD)</li> <li>-Ac. anti-aminoacil t-ARN sintetasas (anti-Jo1, otros)</li> </ul>
<b>Anticuerpos dirigidos contra nucleolos y ribosomas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ac. anti-RNA polimerasa I, II y III (14-220KD)</li> <li>-Ac. anti-Th/To (40KD, 7.2 ARN y 8.2 ARN)</li> <li>-Ac. anti-U3 RNP/fibrilarina (34KD)</li> <li>-Ac. anti-NOR90 (90KD)</li> <li>-Ac. anti-Pm-Sc1 (20-110KD)</li> <li>-Ac. anti-B23/nucleoplasmina (23KD)</li> <li>-Ac. anti-C23 (110KD)</li> <li>-Ac. anti-SRP (59KD)</li> <li>-Ac. anti-MAS (4S ARN)</li> <li>-Ac. antiribosomas P0/P1/P2 (38KD/19KD/17KD)</li> <li>-Ac. anti-ARN</li> <li>-Ac. anti-ARNsa P (38KD)</li> <li>-Ac. anti-APP ribosa polimerasa (116KD)</li> </ul>
<b>Otros anticuerpos antinucleares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ac. anti-Su (50KD)</li> <li>-Ac. anti-Ma</li> <li>-Ac. anti-Me (16-110KD)</li> <li>-Ac. anti-Mi1 y anti-Mi2 (56KD)</li> </ul>



## ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es la enfermedad reumática sistémica autoinmune más frecuente. Se calcula que más de un 1% de la población española presenta la enfermedad de una forma más o menos grave (29). En adultos, la edad de comienzo más frecuente es entre los 30 y los 50 años. Es de dos a tres veces más frecuente en mujeres que en hombres (30).

La artritis es poliarticular y simétrica, afectando fundamentalmente a las articulaciones de los miembros superiores e inferiores, con efusión intrarticular y periarticular. Es clásica la rigidez articular matutina. En contraste con otras artropatías, suele ser erosiva y culmina con la destrucción articular. La enfermedad afecta también a otros órganos y, junto a las alteraciones articulares, pueden aparecer manifestaciones sistémicas como malestar general y fiebre, vasculitis o alteraciones en piel, ojos o pulmón.

El curso de la enfermedad es fluctuante, produciéndose exacerbaciones y remisiones. No existe un tratamiento curativo, dirigiéndose los intentos terapéuticos a la reducción de la inflamación y del dolor y a la preservación de la función articular para evitar la incapacidad funcional.

La artritis resulta de una interacción compleja de células sinoviales con linfocitos en la membrana sinovial (31). El evento inicial que desencadena la lesión articular es desconocido. Se supone que un agente no identificado inicia la inflamación aguda de la membrana sinovial. Posteriormente, péptidos y moléculas de adhesión en las células sinoviales

activadas atraen a linfocitos y monocitos al espacio articular (32). Las células proliferativas sinoviales expresan antígenos CMH de clase II y coestimulan a moléculas que aumentan la activación de células T CD4+ ("helper") infiltrativas (33). Estas, a su vez, estimulan a células B en la membrana sinovial para producir inmunoglobulinas. Algunas células sintetizan localmente anticuerpos de clase IgG, que se unen a otras moléculas de IgG en la articulación para formar inmunocomplejos. Los inmunocomplejos activan la cascada del complemento, provocando sucesivos estados inflamatorios que provocan hinchazón, calor y dolor en las articulaciones. El proceso inflamatorio determina la liberación de proteasas lisosomales, radicales oxigenados y prostaglandinas, que lesionan el colágeno y la matriz cartilaginosa de la articulación. Además, la IL-1 activa las colagenasas, que inducen la reabsorción del hueso.

Por último, la proliferación de las células sinoviales forma una masa granulomatosa, que invade y erosiona el cartílago y otras estructuras de la articulación. No todos estos procesos secuenciales han podido demostrarse definitivamente. Son cuestiones todavía debatidas si el factor reumatoide contribuye a las lesiones, o si la sinovitis reumatoide depende de células T activadas. En las células T obtenidas de articulaciones reumatoideas en fases evolutivas avanzadas, por tanto no representativas de lesiones precoces, faltan marcadores de activación, mostrando poca actividad proliferativa "in vitro" y produciendo pequeñas cantidades de citocinas (34). Dentro de la articulación, linfocinas monocíticas como el factor transformador de crecimiento beta, pueden evitar o disminuir la regulación de la activación de células T (35).

El SS aparece hasta en el 70% de los pacientes con AR (36-42), si bien la prevalencia real es desconocida, dadas las diferencias en los criterios de diagnóstico y en el tiempo de evolución de los pacientes incluidos en los diferentes estudios. La frecuencia del SS aumenta en la AR en relación al tiempo de evolución de la enfermedad (37). Algunos estudios indican una mayor incidencia de manifestaciones extraarticulares y autoanticuerpos en pacientes con SS y AR (43,44), en particular ac. anti-Ro/SSA (38,45).

La amiloidosis secundaria o depósito extracelular de amiloide AA es una complicación poco frecuente de la AR, afecta a un 5-15% de casos (46-49), aunque la incidencia depende del tiempo de evolución (50-52). Es una de las principales causas de muerte debida a la AR.

Finalmente, la anemia de la AR es multifactorial (ferropenia, anemia de trastorno crónico inflamatorio, etc), pero es muy frecuente en pacientes con enfermedad activa.

## AUTOANTICUERPOS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

La tabla IV muestra las diferentes especificidades de autoanticuerpos encontradas en pacientes con AR, clasificadas en razón de su sensibilidad (frecuencia de aparición) y especificidad (restricción a enfermos con AR). A continuación se comentarán por separado cada uno de los autoanticuerpos.

**TABLA IV. Autoanticuerpos en la artritis reumatoide**

	ALTA ESPECIFICIDAD	BAJA ESPECIFICIDAD
FRECUENCIA BAJA		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ac. anti-RNP / Sm</li> <li>• Ac. anti-Ro / La</li> <li>• Ac. anti-ADNdc</li> <li>• Ac. anti-colágeno II</li> <li>• Ac. anticardiolipina</li> </ul>
FRECUENCIA MEDIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ac. anti-RA33 (A2-hnRNP)</li> <li>• Ac. ANTI-SA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ac. anti-histonas</li> </ul>
FRECUENCIA ALTA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor reumatoide</li> <li>• Ac. anti-queratina ( = factores anti-perinucleares)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ac. anti-vimentina</li> <li>• Ac. antinucleares específicos de granulocitos (GS-ANA)</li> <li>• Ac. anti-RANA</li> </ul>

### FACTOR REUMATOIDE

El factor reumatoide (FR) es un autoanticuerpo dirigido contra los bucles aminoacídicos de la región constante de la IgG (53). El FR clásico es de clase IgM y tiene carácter policlonal. Se detecta en un 70-80% de los pacientes con AR y en sólo un 5-10% de pacientes con AR juvenil. Aunque es característico de esta enfermedad, no es específico de la

misma. Su ausencia no excluye el diagnóstico, ya que es relativamente frecuente su aparición después del primer año de evolución. Los inmunocomplejos formados por FR e IgG se han relacionado con las complicaciones vasculares sistémicas de la AR.

El FR se produce normalmente durante la respuesta inmune a antígenos exógenos, observándose a menudo y de forma transitoria, en el suero de pacientes con infecciones virales, bacterianas o parasitarias (54). Asimismo, es relativamente frecuente en otras enfermedades reumáticas, como el LES, la esclerodermia, el SS y los síndromes de solapamiento. Finalmente, ciertos estados hiperglobulinémicos, como son la púrpura hiperglobulinémica, la crioglobulinemia, las hepatopatías crónicas o la sarcoidosis, se asocian con positividad para el FR. Generalmente, en los procesos no reumatológicos los títulos de FR son bajos.

La AR seropositiva (con FR), se caracteriza por un aumento de la incidencia de nódulos reumatoides, vasculitis o enfermedad intersticial pulmonar, y un peor pronóstico articular (55-67). Estos pacientes presentan más alteraciones radiológicas articulares, peor capacidad funcional, más actividad inflamatoria y más manifestaciones extraarticulares (67,68). La mayoría de los estudios muestran que las manifestaciones extraarticulares son más frecuentes en pacientes con AR evolucionada (69) y en presencia de FR u otros autoanticuerpos (67,70).

## ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA)

La presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares es frecuente en pacientes con AR. Su frecuencia oscila entre el 12 y el 71% según las series (43,71-73).

La técnica de laboratorio más utilizada para su detección es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleando como sustrato células tumorales humanas mantenidas en cultivo (HEp-2). El patrón de tinción de fluorescencia y la intensidad de la misma nos orientan acerca de la especificidad del autoantígeno contra el cual van dirigidos los autoanticuerpos y el título de los mismos.

El patrón homogéneo es el más frecuente en los sueros de pacientes con AR (73). Se caracteriza por una tinción uniforme y difusa de todos los núcleos en interfase. La intensidad de fluorescencia es más prominente en la región cromosómica de las células en mitosis. Este patrón se obtiene cuando el suero contiene anticuerpos antinucleares dirigidos contra ADN, desoxirribonucleoproteínas o histonas.

En el patrón granular se observan gránulos más o menos gruesos en los núcleos en interfase, siendo negativa la región de condensación cromosómica de los núcleos en división. Aparece cuando existen anticuerpos antinucleares dirigidos contra antígenos nucleares extraíbles de soluciones salinas de baja fuerza iónica (ENA).

El patrón mixto supone una mezcla de autoanticuerpos antinucleares de más de una especificidad, siendo el aspecto por IFI una mezcla de los dos patrones anteriormente descritos.

Se ha sugerido que la presencia de anticuerpos antinucleares en AR se asociaría con una mayor frecuencia de manifestaciones extraarticulares (74) y un peor pronóstico articular (55), aunque no ha sido establecido definitivamente (75).

## **ANTICUERPOS ANTI-HISTONAS**

Los anticuerpos anti-histonas están dirigidos contra proteínas constituidas por aminoácidos básicos como arginina y lisina, distinguiéndose cinco variedades principales de histonas, denominadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas H2A y H2B son ricas en lisina, mientras el resto son ricas en arginina.

El isotipo más frecuente de los anticuerpos anti-histonas es el de clase IgM frente al de clase IgG. Estos autoanticuerpos no son exclusivos de AR. Se detectan en un 20-24% de los casos (72,76) y hasta en un 44% de pacientes con positividad para FR (77). Su principal utilidad clínica es servir como marcador serológico del lupus eritematoso inducido por fármacos (procainamida, isoniácida y nitrofurantoína) y de LES.

## ANTICUERPOS ANTI-ADN

Los anticuerpos anti-ADN bicatenario o nativo reconocen determinantes antigénicos localizados en el enlace fosfo-diéster de la cadena de ADN y constituyen un marcador serológico de LES. Los niveles séricos de anticuerpos anti-ADN fluctúan con la actividad de la enfermedad. El depósito de inmunocomplejos ADN-anti-ADN a nivel renal en los enfermos con LES confiere a estos anticuerpos un significado patogénico. A diferencia de los anti-ADN monocatenario, los anticuerpos anti-ADN nativo se detectan de forma excepcional en pacientes con AR, generalmente títulos o niveles bajos, en un 0.2% (78) a 0.6% (79) de los pacientes.

Algunos estudios, con la técnica de Farr, detectan anticuerpos anti-ADN en porcentajes que oscilan entre el 1% y el 9% de pacientes con AR (72,80-85). Aunque en un pequeño porcentaje de los casos se demuestra la presencia de anticuerpos anti-ADN nativo de alta avidéz, generalmente los resultados positivos se deben a reacciones cruzadas con ADN monocatenario contaminante (86) o a anticuerpos anti-ADN nativo de baja avidéz (87). El interés clínico de estas dos variedades citadas es nulo (73).

Los anticuerpos anti-ADN monocatenario aparecen hasta en el 4-8% de los casos (72,78,88). Koffler y colaboradores (89), utilizando un técnica de radioinmunoensayo, los detectan hasta en el 50% de los pacientes.



## ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS NUCLEARES EXTRAIBLES

Los ENA son macromoléculas acídicas no histonas, extraídas de la fracción soluble salina de los núcleos celulares. Estos antígenos están generalmente constituidos por proteínas asociadas a ácidos ribonucleicos (ARNs) de pequeño tamaño, ricos en uridina.

### ANTI-Sm Y ANTI-nRNP

Estos autoanticuerpos fueron descubiertos en sueros de pacientes con LES (90-93). Lerner y Steitz (94) demostraron que reaccionan con proteínas asociadas a ácidos ribonucleicos pequeños (UARNs). Estas partículas ribonucleoproteicas pequeñas (snRNPs) están involucradas en el "splicing" de los precursores de los ARNs mensajeros. (95-97). Los determinantes antigénicos se localizan en la fracción proteica de las partículas, dado que los autoanticuerpos son incapaces de inducir la precipitación de la fracción no proteica de las snRNPs. (98)

El complejo Sm consta de los ARNs denominados U1, U2, U4/6, y U5, asociados a las proteínas denominadas B' (de peso molecular 29 KD), B (28 KD), D (16 KD) y E (13 KD). La reactividad de los anticuerpos anti-Sm se dirige principalmente contra las proteínas B, B' y D. (99). Existe, al menos, un epítipo común, dado que algunos anticuerpos monoclonales son capaces de reaccionar con las tres proteínas.

Los epítomos relacionados con los anticuerpos anti-nRNP se localizan en la partícula U1 snRNP, que contiene U1 ARN asociado a proteínas de peso molecular 70 KD, 33 KD (denominada A) y 22 KD (denominada C). Estas dos últimas, las proteínas A y C, se unen a la matriz nuclear mediante la proteína de 70 KD (100), que no es parte, propiamente dicha, del complejo U1 snRNP. Ciertos sueros anti-nRNP reaccionan también con las proteínas A' y B'', que junto al U2 ARN forman el complejo U2 snRNP.

Los anticuerpos anti-Sm D son exclusivos de los enfermos con LES, aunque, mediante "immunoblotting" (IB), se detectan anticuerpos que reconocen las proteínas B y B' en otras conectivopatías, incluyendo un porcentaje muy bajo (4%) de pacientes con AR (101).

Los anticuerpos anti-nRNP se detectan en un 95-100% de pacientes con EMTC, en un 30-50% de pacientes con LES y en un pequeño porcentaje de pacientes con otras enfermedades reumáticas (76,98). En la AR, mediante técnicas de inmunodifusión o contraelectroforesis (CIE), se han detectado en un 1-10% de pacientes. (102-105).

En resumen, en la AR se detecta un bajo porcentaje de anticuerpos dirigidos contra snRNPs, que reconocen, en IB, los péptidos A, BB' o C aisladamente, nunca el de 70 kD o el D. Estos anticuerpos no son precipitantes, y la CIE es negativa (106).

La presencia de anticuerpos anti-nRNP en AR se ha relacionado con una mayor frecuencia de vasculitis (56) y otras manifestaciones extraarticulares (107) en estudios realizados con hemaglutinación pasiva,

inmunodifusión ó CIE. Asimismo se han asociado con la presencia de nódulos reumatoides cuando se detectan mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) con extracto total de timo de conejo (108).

### **ANTI-RO / SS-A**

El antígeno Ro/SS-A es una partícula ribonucleoproteica formada por una proteína de 60 KD asociada a pequeños ARNs denominados hYARNs, con longitudes comprendidas entre 83 y 112 bases (109-113). La función de estas ribonucleoproteínas es desconocida, y su localización celular depende del estado funcional de la célula, siendo nuclear en el caso del SS-A, y citoplasmática en el denominado antígeno Ro. En los últimos años se ha descrito un segundo componente proteico de la partícula Ro-ARN, una proteína de peso molecular 52 KD. Estudios recientes muestran que el polipéptido de 52 KD no forma parte realmente de la partícula Ro y los anticuerpos anti-52KD no son estrictamente anticuerpos anti-Ro, dado que dicho polipéptido no se une a los Ro-hYARN (114). Sin embargo, aunque se desconoce la relación exacta entre los anticuerpos anti-52KD y anti-Ro, suelen aparecer en las mismas enfermedades, y la mayoría de los sueros anti-52KD contienen anticuerpos anti-Ro (115). Una tercera proteína de 48 KD podría formar parte también del complejo Ro, aunque no ha sido confirmado (116). Es interesante destacar que los YARNs son especie-específicos, por lo que los anticuerpos anti-Ro están dirigidos selectivamente contra ribonucleoproteínas humanas (117), al contrario de lo que ocurre con otros anticuerpos antiribonucleoproteínas.

Los anticuerpos anti-Ro se detectan en un 60-80% de pacientes con SS, en un 30-40% de pacientes con LES y, en una proporción más baja, en otras conectivopatías (76,98). Se detectan en un 3-10% de pacientes con AR (118-124), y en una proporción algo mayor si se asocia a SS (119,125,126). Los sueros de pacientes con AR, LES o SS, pueden contener anticuerpos anti-Ro 60 KD nativo, detectado mediante CIE o ELISA, pero el IB puede reconocer proteínas 60 KD-Ro y/o 52 kD. Los anticuerpos anti-Ro (60 KD) aislados parecen ser más frecuentes en el LES y en la AR (127), mientras los anticuerpos anti-Ro de 52 kD aislados suelen aparecer en el SS primario (128) y en el lupus neonatal.

Aproximadamente un 15% de sueros anti-Ro positivo en inmunodifusión son negativos en IB (111,128), lo que sugiere que se hallan dirigidos contra epítomos conformacionales de la partícula Ro 60 KD nativa, los cuales se pierden durante el proceso de desnaturalización de proteínas en el IB (45). La mayoría de los sueros anti-Ro de 60 KD parecen contener anticuerpos dirigidos, tanto contra el antígeno desnaturalizado, como contra la proteína nativa (45).

Boire y colaboradores (45) sugieren que los pacientes con AR y anticuerpos anti-Ro presentan un curso clínico más agresivo y peor respuesta al tratamiento. Ménard y colaboradores (129) han definido un subgrupo de AR caracterizado por la presencia de anticuerpos anti-Ro nativo y la ausencia de anticuerpos dirigidos contra las proteínas Ro desnaturalizadas. En este subgrupo, los pacientes muestran una AR típica y, tras varios años de evolución, presentan algunas manifestaciones clínicas y analíticas similares a las del LES (leucopenia, serositis, lesiones de lupus cutáneo subagudo y anticuerpos anti-ADN nativo).

## ANTI-LA / SS-B

El antígeno La/SS-B es una proteína de 48 KD (130-132) de localización predominantemente nuclear unida a diferentes ARNs virales y humanos. Su función se relaciona con la terminación de la transcripción por parte de la enzima ARN polimerasa III. (133).

Los anticuerpos anti-La se detectan mediante inmunodifusión ó CIE en un 50-60% de pacientes con SS, en un 10-15% de pacientes con LES y en algunos pacientes con otras conectivopatías (76,98). Con frecuencia aparecen conjuntamente con anticuerpos anti-Ro, aunque no ocurre al contrario (98). Los anticuerpos anti-La son poco frecuentes en la AR, donde se hallan entre el 0 y el 1.7% de los casos (118,134), y entre el 3 y el 8% si dicha enfermedad se asocia a SS (105,118,125,135). Mediante IB aparecen en un 6% de pacientes con AR (136) y hasta en un 22% si se determinan mediante ELISA (137).

En conjunto, los anticuerpos anti-ENA en la AR se detectan en un bajo porcentaje de pacientes, entre un 4 y un 16% utilizando técnicas de hemaglutinación, CIE o IB (103,136,138,139), y hasta en el 30% de los casos utilizando ELISA (107). Parecen ser más frecuentes en pacientes con vasculitis reumatoide (18%-70% según las técnicas) (56,107,108,140,141) y asociarse a un peor pronóstico vital de la enfermedad (141).

## ANTICUERPOS ANTICITOESQUELETO

El citoesqueleto es un conjunto de proteínas que mantienen la estructura y motilidad celulares, permitiendo así la función de las organelas. El citoesqueleto está formado por tres tipos de estructuras fibrilares: microfilamentos (actina), filamentos intermedios (vimentina, queratina, desmina, filamentos gliales y neurofilamentos) y microtúbulos (tubulina) (142). Los sueros de pacientes con AR reaccionan frecuentemente con la vimentina y la queratina (143).

Los anticuerpos antivimentina aparecen en un 54-80% de pacientes y no son específicos de la AR (144-147). Los anticuerpos antiqueratina se detectan en un 30-70% de casos (146-148) y suelen ser de clase IgG. Se detectan mediante IFI sobre cortes de esófago de rata (145) y no se deben a reacciones cruzadas con FR IgG (148). Se ha sugerido que son específicos de AR (145, 149-151) y pueden aparecer en fases iniciales de la enfermedad (152), incluso antes del inicio de los síntomas (148). Vincent y colaboradores (153) revisaron 4080 pacientes publicados, 1694 con AR, y encontraron que los anticuerpos antiqueratina tienen una sensibilidad de 46% y una especificidad de 98% en la AR. Pueden aparecer ocasionalmente en otras enfermedades (146,150) e incluso en individuos sanos (154). Algunos estudios muestran que la especificidad es menor, ya que se detectan hasta en un 10% de pacientes con otras enfermedades reumáticas, incluyendo esclerodermia (20%) y espondilitis anquilopoyética (25%) (155). Scott y colaboradores (156) los encuentran en 16 pacientes con esclerodermia. Los anticuerpos antiqueratina se han relacionado con una mayor frecuencia de nódulos reumatoides, mayor

actividad inflamatoria, presencia de FR y ANA y peor pronóstico (146,147,149-151).

### **ANTICUERPOS ANTICITOPLASMATICOS.**

Los anticuerpos antinucleares específicos de granulocitos (GS-ANA) fueron descritos en pacientes con síndrome de Felty (157) y se detectan en un 75% de pacientes con AR y en un 85-95% si la enfermedad asocia neutropenia (158,159). Se han relacionado con enfermedad más grave. Actualmente se sabe que reaccionan contra proteínas de los gránulos azurófilos citoplasmáticos de los neutrófilos (160).

Los denominados factores antiperinucleares se detectan mediante IFI sobre células de la mucosa bucal humana (161). Aparecen en el 50-86% de los pacientes con AR (151,155,162-166) y en individuos sanos (163). Muñoz y colaboradores (155) encuentran una sensibilidad de 64% y una especificidad de 80% en AR. Los anticuerpos suelen ser de clase IgG y el antígeno se localiza en gránulos queratohialinos del citoplasma, junto a la profilagrina (162). La presencia de factores perinucleares séricos en AR se ha relacionado con enfermedad más grave (167,168) y con los anticuerpos antiqueratina (162,169). Un estudio reciente no encuentra correlación con la actividad clínica (155).

## **ANTICUERPOS ANTI-RANA ("RHEUMATOID ARTHRITIS NUCLEAR ANTIGEN")**

Los anticuerpos anti-RANA, descubiertos por Alspaugh y colaboradores (170,171) en pacientes con SS asociado a AR, se detectan en un 70-90% de pacientes con AR, en otras conectivopatías y enfermedades reumáticas, e incluso en controles sanos (119,172,173). El antígeno RANA aparece exclusivamente en células infectadas por el virus de Epstein-Barr (125). Es un antígeno muy soluble, de peso molecular 80 KD e idéntico al EBNA ("Epstein-Barr nuclear antigen") (172,174,175), aunque la elevación de los niveles de anticuerpos anti-RANA no siempre es paralela al aumento de anticuerpos anti-EBNA (176). Probablemente los anticuerpos anti-RANA y anti-EBNA se unen a epítomos diferentes del mismo polipéptido (177,178). Actualmente se acepta que estos anticuerpos no son específicos de AR, no detectándose en fases precoces de la enfermedad (179,180).

## **ANTICUERPOS ANTI-RA33**

Los anticuerpos anti-RA33 fueron identificados por Hassfeld y colaboradores (181-183) mediante la técnica de IB con extractos nucleares solubles de células HeLa. El antígeno RA33 tiene un peso molecular de 33 kD siendo resistente a la digestión con ADNsa y ARNsa, y sensible a la proteinasa K. Se ha demostrado que corresponde a la proteína A2-hnRNP de la matriz nuclear (184).



Los anticuerpos anti-RA33 aparecen en el 33% de AR (181,184,185), pero también en LES y EMTC (184,185). Por tanto, la sensibilidad y la especificidad de dichos anticuerpos en la AR es sólo de un 35 y 78% respectivamente. En estos estudios no se encuentra ninguna correlación clínica.

## **OTROS ANTICUERPOS**

En la AR se detectan anticuerpos séricos anti-colágeno II en un 15% de pacientes. No son específicos (186,187) y no aparecen al inicio de la enfermedad (188). Se detectan anticuerpos anticardiolipina en un 13-33% de pacientes (189,190), sin ninguna correlación clínica.

Recientemente se han detectado mediante IFI anticuerpos antiproteus en el suero de pacientes con AR. Se ha sugerido que esta respuesta es específica (191), pero puede deberse a reacciones cruzadas con otros anticuerpos o a una activación policlonal. En dichos pacientes no se detectan otros anticuerpos antibacterianos ni antivirales (191-193), ni se relaciona la presencia de anticuerpos antiproteus con autoanticuerpos (193). Los títulos antiproteus son significativamente mayores si la enfermedad es muy activa.

## **DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE ARTRITIS REUMATOIDE**

Ninguno de los autoanticuerpos citados son específicos de AR, incluyendo los anticuerpos anti-RA33, recientemente descritos (184). El

FR es el dato serológico más útil entre los posibles marcadores de la AR. Aparece en sólo el 70% de los pacientes y, con frecuencia, no se detecta desde las fases iniciales de la enfermedad. No es específico de AR, aunque su detección ha sido incluida como uno de los criterios de clasificación de la AR (194).

### ANTICUERPOS ANTI-SA

Los anticuerpos anti-Sa fueron identificados en el curso de ensayos destinados a identificar los diferentes polipéptidos asociados a la partícula Ro-ARN (195). Utilizando extractos de bazo humano, se identificaron sueros que reaccionaban en IB con una proteína de 48-50 KD no identificada previamente (196). Se denominaron anticuerpos anti-Sa en referencia a que el primer suero identificado pertenecía a una paciente llamada "Savoie" (196).

El antígeno Sa se obtiene de extractos salinos de bazo y placenta humanos, pero se desconoce su localización celular y su naturaleza. Se ha detectado en la membrana sinovial de pacientes con AR (197). Es un antígeno poco soluble, resistente a ribonucleasas y neuraminidasa y sensible a tripsina (198). Los anticuerpos anti-Sa no precipitan en geles de agarosa y la precipitación inmune contra células HeLa  $^{32}\text{P}$  demuestra que no está asociado a ARNs (199,200).

Las electroforesis realizadas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizadas, muestran que es diferente a otros autoantígenos conocidos. Los sueros con anticuerpos anti-ENA no

reaccionan con el antígeno Sa en IB y el patrón de bandas obtenido es diferente. Además, la frecuencia de los anticuerpos anti-Sa en AR es diferente de la encontrada con otros autoanticuerpos.

Los anticuerpos anti-Sa se detectan mediante IB en un 30-40% de pacientes diagnosticados de AR, y parecen ser específicos de la enfermedad (71, 196, 200, 201). Los primeros estudios clínicos sugieren que los anticuerpos anti-Sa definen un subgrupo de AR grave, con mayor incidencia de manifestaciones extraarticulares (202).

En un estudio reciente que incluía 482 pacientes con AR y otras conectivopatías, así como controles sanos, los anticuerpos anti-Sa como prueba diagnóstica de AR presentaban una sensibilidad del 42.7%, una especificidad de 98.9%, un valor predictivo positivo de 96.7% y un valor predictivo negativo de 69.8% (203). Los valores predictivos elevados sugieren una posible implicación patogénica de los anticuerpos anti-Sa en un subgrupo de pacientes con AR.

Existen indicios consistentes en favor de la implicación del sistema antigénico Sa en la patogenia de la AR. En primer lugar, la alta especificidad de los anticuerpos anti-Sa para AR. En segundo lugar, su alta prevalencia. Tercero, el hecho de que los anticuerpos anti-Sa se detectan desde las fases iniciales de la enfermedad (200, 202, 204) y son de tipo IgG, lo que sugiere que se está produciendo, ya desde el comienzo de la enfermedad, una respuesta autoinmune dirigida por el antígeno. En cuarto lugar, la presencia del antígeno Sa en el pannus inflamatorio sugiere la formación "in situ" de anticuerpos anti-Sa, y sugiere un posible papel patogénico del antígeno en la iniciación y mantenimiento del

proceso destructivo crónico observado en la AR (197). En quinto lugar, se ha identificado un polipéptido de 48 KD en inmunocomplejos circulantes de pacientes con AR (205). Finalmente, el estudio longitudinal de pacientes con AR en cuyo suero se detectó anti-Sa, demostró la fluctuación del mismo según la evolución de la enfermedad, apareciendo en los períodos de mayor actividad y negativizándose en fases de remisión (206). Hay datos sugerentes de una aparente modulación de la respuesta por tratamientos antirreumáticos.

Estos hechos diferencian el sistema Sa de otros marcadores autoinmunes asociados con la AR. Desde 1988, los Servicios de Inmunología (profesor E. Fernández-Cruz) y Reumatología (profesor E. Carreño) del Hospital Universitario "Gregorio Marañón", Universidad Complutense de Madrid, colaboran con la Unidad de Enfermedades Reumáticas y el Laboratorio de Inmunoreumatología (profesores Henri-A Mènard y Gilles Boire) del Centro Hospitalario Universitario, Universidad de Sherbrooke, Quèbec, en el estudio del sistema autoinmune Sa/Anti-Sa; el estudio de su valor diagnóstico y pronóstico; y la purificación, caracterización e identificación del antígeno Sa. Actualmente, los anticuerpos anti-Sa se detectan mediante IB, y se trabaja en la optimización de una técnica de ELISA con antígeno Sa purificado, si bien los problemas para obtener dicho antígeno (207), hacen difícil, por el momento, su utilización rutinaria.

## JUSTIFICACION

La detección de los anticuerpos anti-Sa puede ser útil en el diagnóstico precoz de la AR. El principal problema que se plantea es que la técnica de detección de los anticuerpos anti-Sa, el IB, es laborioso y complejo y, en la práctica, no puede utilizarse como prueba de despistaje de la enfermedad en la población general. La IFI sería el método alternativo idóneo por su sencillez y bajo costo. Sin embargo, actualmente, se desconoce cuál es el patrón de inmunofluorescencia anti-Sa, si es diferente a otros patrones nucleares o citoplasmáticos, cuál es la localización subcelular del antígeno Sa, y cuál es el sustrato idóneo para obtener una adecuada tinción de fluorescencia. Por otro lado, la localización del antígeno Sa a nivel subcelular, tendría el interés de permitir esclarecer el posible papel biológico de dicho antígeno.

Debido a lo anteriormente expuesto, proponemos los siguientes objetivos :

## **OBJETIVOS**

- 1.- Estudiar y caracterizar el patrón de inmunofluorescencia anti-Sa en diferentes sustratos y establecer el sustrato idóneo para su detección.
- 2.- Evaluar la sensibilidad del método IFI para detección de anticuerpos anti-Sa, comparándolo con la técnica de referencia (IB).
- 3.- Determinar el valor semicuantitativo del método de IFI para la detección de anticuerpos anti-Sa.
- 4.- Investigar la localización del antígeno Sa a nivel subcelular.
- 5.- Determinar la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos anti-Sa mediante IFI. Estudio de las correlaciones entre los parámetros clínicos y los anticuerpos anti-Sa detectados por IFI. Estudio comparativo con la técnica de referencia (IB).

## MATERIAL Y METODOS

### 1. TECNICAS EMPLEADAS

En la tabla V se resumen las principales técnicas empleadas para la detección de autoanticuerpos.

**TABLA V. Esquema de metodología de trabajo**

<b>TECNICA</b>	<b>Sustrato o extracto</b>	<b>AUTOANTICUERPOS DETECTABLES</b>
<b>Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</b>	<b>Tejidos de rata</b>	<b>ANA, AMA, ASMA, CPG</b>
	<b>Células HEp-2</b>	<b>ANA</b>
	<b>Tejidos de mono</b>	<b>AAA, AAT, ICA</b>
	<b>Neutrófilos</b>	<b>ANCA</b>
	<b>Hígado humano</b>	<b>ANA, AMA, LKM</b>
	<b>Placenta</b>	<b>AAC</b>
	<b>Células JAR</b>	<b>ANA, AMA</b>
<b>Contrainmuno-electroforesis (CIE)</b>	<b>Timo</b>	<b>ENA</b>
	<b>Placenta</b>	<b>ENA</b>
<b>Enzimoimmunoensayo (ELISA)</b>	<b>Histonas</b>	<b>AAH</b>
	<b>ADN nativo</b>	<b>ADNn</b>
<b>"Inmunoblotting" (IB)</b>	<b>Timo</b>	<b>ENA</b>
	<b>Placenta</b>	<b>ENA, SA</b>

**Abreviaturas :** ANA : anticuerpos antinucleares; AMA : anticuerpos antimitocondriales; ASMA : anticuerpos anti-músculo liso; CPG : anticuerpos anti-células parietales gástricas; AAA : anticuerpos anti-adrenales; AAT : anticuerpos antitiroideos; ICA : anticuerpos contra células de los islotes pancreáticos; ANCA : anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos; LKM : anticuerpos antimicrosomales hepatorreñales; AAC : anticuerpos anti-citotrofoblásticos; ENA : anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles; AAH : anticuerpos antihistonas; ADNn : anticuerpos anti-ADN nativo; SA : anticuerpos anti-Sa.

## 1.1. TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

### 1.1.1. PROCEDIMIENTO GENERAL

La IFI se realizó según la técnica de Roitt y Doniach, con algunas modificaciones (208). Los sueros a estudiar son diluidos en "buffer" salino fosfato (PBS) (fosfato sódico 0.01 M, cloruro sódico 0.14 M, pH 7.2). Como control de la técnica se utilizan en cada ensayo un suero humano normal como control negativo y un suero positivo para diversas especificidades (anticuerpos antinucleares, antimitocondriales ó antimúsculo liso). Se colocan 50  $\mu$ L de las diluciones apropiadas de los sueros a testar sobre el sustrato elegido, y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos en cámara húmeda. Sobre sustrato de placenta humana se incrementó a 60 minutos el tiempo de incubación.

A continuación, se lavan los portaobjetos tres veces, con agitación suave, durante un total de 10 minutos, utilizando PBS, para eliminar el exceso de suero no fijado al sustrato. Posteriormente, se realiza una incubación con inmunoglobulina de conejo anti-humana polivalente conjugada con fluoresceína y azul de Evans (Bios GmbH, München, Germany), incubando 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los portaobjetos son lavados en PBS, como se describió anteriormente, y cubiertos con un cubreobjetos en medio de montaje (2 volúmenes de glicerol y un volumen de NaOH 0.017 M, NaCl 0.18 M, glicina 0.29 M, pH 8.6). Los portaobjetos son examinados mediante microscopio de fluorescencia (NIKON Optiphot, Japan). Se anota el patrón de fluorescencia y la intensidad de la misma.



## **1.1.2. PREPARACION DE SUSTRATOS PARA TECNICA DE IFI**

### **1.1.2.1. HIGADO, RIÑON Y ESTOMAGO DE RATA (BLOQUE COMPUESTO)**

A una rata "wistar" sacrificada, de aproximadamente 250 g de peso, se le extraen el hígado, los riñones y el estómago, de los cuales se hacen bloques de tamaños apropiados para los pocillos utilizados en la técnica. Los tejidos, cohesionados mediante medio de inclusión OCT (Tissue Tek Compound, Miles Elkhart Inc., USA) se congelan, ya dispuestos sobre platinas, por inmersión en nitrógeno líquido, manteniéndose hasta tres meses a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, utilizando un criostato, se realizan cortes de los tejidos de 4  $\mu\text{m}$  de espesor y se transfieren a portaobjetos de 4 pocillos de 9 mm (Cultek, España), secándose al aire con ventilador, durante aproximadamente una hora, utilizándose posteriormente como sustrato para la técnica de IFI.

### **1.1.2.2. LINEA CELULAR HEp-2**

La línea HEp-2 es una línea tumoral de carcinoma laríngeo humano. Las células crecen en monocapa y son adherentes. Como norma general, se siembran 25.000 células por  $\text{cm}^2$ , por lo que en un "flask" de 80  $\text{cm}^2$  se colocan  $2 \times 10^6$  células, manteniéndolas en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Como medio de cultivo se utiliza medio RPMI con adición de glutamina 2%, solución antibiótica 2% y suero de ternera fetal 10%, el cual se cambia al segundo día. Durante el cultivo

debe vigilarse el grado de confluencia para realizar los "pases" del cultivo en el momento apropiado, y el color del medio, que es indicativo del pH y por tanto del consumo de nutrientes de las células.

Para preparar muestras congeladas de células HEP-2, se utiliza un medio de congelación con suero de ternera fetal, con adición de dimetilsulfóxido (DMSO) al 20%, guardándolas a largo plazo en un congelador de nitrógeno líquido. Se procede a su descongelación posteriormente, en un baño a 37°C y se lavan las células dos veces con medio de cultivo, resuspendiendo y colocando las células en un "flask".

La preparación de las células para sustrato de IFI a partir del cultivo celular, se realiza mediante el procedimiento descrito a continuación: los portaobjetos se sumergen en etanol y posteriormente se flamean y esterilizan en autoclave durante 45 minutos a 140°C. El sobrenadante del medio de cultivo se aspira, y el contenido restante se lava dos veces con PBS (pH 7.4). Se añaden 2 mL de solución de tripsina-EDTA (BIOCHROM) y se coloca el "flask" 3 minutos a 37°C en estufa. Posteriormente se agita el contenido con el fin de conseguir el máximo despegamiento celular, y se añaden 10 mL de medio de cultivo para parar la tripsinización. Se recoge el producto en un tubo y se centrifuga 10 minutos a 400 g. Posteriormente se realiza recuento de las células y estimación de la viabilidad diluyendo las células 1:10 en azul tripán al 0,1% en suero fisiológico (450 µL de solución de azul tripán y 50 µL de células). La muestra se ajusta a una concentración de 50.000 células/mL y se toman muestras de 60 µL, conteniendo 3.000 células por pocillo, para realizar preparaciones de citocentrífuga. Los portas, colocados en placas de Petri, se dejan en estufa hasta el día siguiente. Después se procede a su

fijación, sumergiendo los portas en PBS calentado a 37°C y posteriormente en metanol enfriado a -20°C durante 10 minutos. Se realizan dos lavados con PBS en agitación continua y finalmente se seca la zona situada entre los pocillos, quedando listos para la técnica de IFI.

### 1.1.2.3. TEJIDOS DE MONO

Se utilizaron preparaciones comerciales de diversos tejidos de mono (*Cynomolgus SP*) (BIOS GmbH, München, Germany). Los tejidos se presentan en cortes de 4 µm de espesor, preparados en portaobjetos de 4 pocillos. Se emplearon muestras de corteza adrenal, islotes pancreáticos y tiroides de mono, sustratos empleados habitualmente en la determinación de diversos autoanticuerpos organoespecíficos.

### 1.1.2.4. NEUTROFILOS HUMANOS

Las preparaciones de neutrófilos humanos se obtienen mediante el siguiente procedimiento : en tubos de 10 mL de fondo redondo, se ponen 3 mL de POLYPREP (Hucoa-Erlöss) por tubo. La sangre heparinizada se diluye 1:1 con PBS (pH 7,4) y se colocan aproximadamente 5 mL de la dilución, de forma cuidadosa, en cada uno de los tubos que contienen POLYPREP, evitando la mezcla de la sangre con dicho producto. Se centrifuga a 1.000 g durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente se recoge el material de la interfase entre la sangre y el POLYPREP, que contiene los polimorfonucleares. Dicho material se lava mediante mezcla con PBS y posterior centrifugación a 500 g durante 10

minutos a temperatura ambiente. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el "pellet", realizando otros dos lavados con PBS a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los hematíes contaminantes se eliminan mediante la adición de 1 mL de agua destilada y agitación de 1 minuto entre el segundo y el tercer lavados. El producto final se resuspende en 1 mL de PBS. La composición celular se analiza mediante dilución 1:10 con azul de Turk y visualización microscópica para comprobar su composición mayoritaria de polimorfonucleares. Se añaden 9 mL de PBS y se cuentan las células mediante observación en cámara de Neubauer. Tras una nueva centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspende el "pellet" en cantidad suficiente de PBS para ajustar a una concentración final de  $5 \times 10^5$  células/mL. Se toman muestras de 100  $\mu$ L, conteniendo 50.000 células por porta, para realizar preparaciones de citocentrífuga. Sin dejar que se sequen las preparaciones, se introducen en etanol (98%) enfriado previamente a 4°C. Las preparaciones se conservan sumergidas en etanol a -40°C durante varios días en caso de no ser utilizadas de inmediato. Antes de su uso, se dejan a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y posteriormente se utilizan como sustrato para la técnica de IFI.

#### **1.1.2.5. HIGADO Y PLACENTA HUMANOS**

Las muestras de hígado humano fueron obtenidas durante la realización de biopsias hepáticas diagnósticas, utilizándose exclusivamente aquellas muestras sanas según los criterios anatomopatológicos. Las placentas se obtuvieron, tras el consentimiento correspondiente, de mujeres sanas y tras partos eutócicos a término. Una vez eliminadas las

membranas, el cordón y la mayor cantidad posible de sangre, se eligió un cotiledón de la parte central de la placenta.

Ambos tipos de tejido se disponen como bloques cúbicos de aproximadamente 0.7 cms de lado, que se congelan con nitrógeno líquido y se mantienen en arcón congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta realizar el ensayo. Posteriormente se cortan mediante criostato, con el mismo método descrito para los tejidos de rata (punto 1.1.2.1), utilizándose como sustrato para la técnica de IFI.

#### 1.1.2.6. LINEA CELULAR JAR

La línea celular JAR procede de un coriocarcinoma humano. Son células adherentes, de crecimiento en monocapa, tamaño grande, con núcleo voluminoso y citoplasma escaso. Secretan al medio gonadotropina coriónica y lactógeno placentario. El subcultivo de las células se realiza según el siguiente protocolo: se retira el sobrenadante del cultivo y se añaden 5 mL de solución de tripsina-EDTA (BIOCHROM) para un "flask" de 75 cm<sup>2</sup>. Se deja actuar la tripsina durante 5 minutos, agitando suavemente y se dispersan las células con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico. Una vez pasadas a un tubo universal de 20 mL se añaden 2 volúmenes de medio de cultivo complementado (RPMI 1640, suero de ternera fetal descomplementado al 10%, L-glutamina al 0,5%, solución antibiótica al 0,5% de gentamicina al 4%, cloxacilina al 12% y ampicilina al 12%; y HEPES al 2%). Se centrifugan a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantan y se resuspende el sedimento, repitiéndose la misma operación, y posteriormente se decantan y se

resuspenden en un volumen adecuado para contarlas. El contaje se realiza en cámara de Neubauer, diluyendo las células 1:10 en azul tripán al 0,1% en suero fisiológico (450  $\mu$ L de solución de azul tripán y 50  $\mu$ L de células). Las células se siembran a una concentración de 750.000 células/15 mL en un "flask" de 75 cm<sup>2</sup> y se dejan crecer durante tres días.

Las células se siembran posteriormente en placas de 8 pocillos, con 300  $\mu$ L de medio de cultivo y 10<sup>5</sup> células por pocillo. Se incuban durante 48 horas en estufa a 37°C y con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. A las 48 horas se tripsinizan, se lavan y se preparan portas para citocentrífuga, dispensando 15.000 células por porta, y se centrifugan a 400 r.p.m. durante 10 minutos. Posteriormente se fijan las células con etanol : acético (95 : 5 v/v) a 4°C durante 20 minutos y se lavan los portas con PBS durante 10 minutos, quedando preparado el sustrato para IFI.

En algunos ensayos se utilizaron células JAR estimuladas. Para ello, se trataron las células JAR con diversos estímulos de la actividad P450 aromatasas, a varias concentraciones de los productos. Con esta finalidad se utilizaron dibutiril-AMPc (a concentraciones 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM), teofilina (0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM), phytohemaglutinina (1 mg/mL y 10 mg/mL) y finalmente phorbol myristate acetate (PMA) (10 mg/mL y 50 mg/mL).

Se siembran 10<sup>5</sup> células en placas de 24 pocillos, con 500  $\mu$ L de medio de cultivo complementado. Se añaden a cada pocillo 10  $\mu$ L de cada una de las diluciones de los estímulos, previamente preparadas, y se incuban durante 24 horas a 37°C en cámara húmeda, con un 5% de CO<sub>2</sub>.

A las 24 horas se tripsinizan, se lavan y se preparan como sustrato para realizar la técnica de IFI según el sistema anteriormente descrito.

## **1.2. TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS**

### **1.2.1. PROCEDIMIENTO GENERAL**

La CIE se realizó siguiendo el método de Kurata y Tan (103), utilizando una cámara de electroforesis ATOM AC/15. Los sueros se descomplementan manteniéndolos a 56°C durante 30 minutos, diluyéndose 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 en PBS. En cada portaobjetos se colocan 0,5 mL de una solución de agarosa al 1%, cubriendo toda la superficie. Después de un secado de 24 horas a temperatura ambiente con ventilación, se colocan en cada porta 3,5 mL de agarosa al 0,6% (agarosa 0,6%, polietilenglicol 0,8%, veronal 0,05 M; pH 8,6). A las 24 horas se realizan dos filas paralelas de pocillos de 3 mm de diámetro, separadas entre sí 4 mm. Los portas se colocan en la cubeta de electroforesis conteniendo 250 mL de solución de veronal 0,05 M (pH 8,6), aplicando 30 µL de los sueros a estudiar en las filas izquierdas de los portas, a las diluciones elegidas. Después de realizar la electroforesis, 10 minutos a 3 mA, se aplican 30 µL del extracto antigénico apropiado en los pocillos practicados en las filas derechas de los portaobjetos. Posteriormente se realiza una electroforesis de 45 minutos a 3 mA y se guardan los portaobjetos en cámara húmeda a 4 grados hasta su lectura. Se considera

positiva la presencia de autoanticuerpos en el suero problema cuando se obtienen reacciones de identidad con los sueros de referencia positivos.

## **1.2.2. PREPARACION DE EXTRACTOS ANTIGENICOS PARA CIE**

### **1.2.2.1. EXTRACTO DE TIMO DE CONEJO**

Se utilizó timo de conejo precipitado con acetona y liofilizado. La extracción se realizó a 4°C siguiendo el protocolo de Kurata y Tan (103) con algunas modificaciones (209-211).

El liofilizado de timo se suspendió en Tris-HCl 50 mM, NaCl 350 mM (pH 7,4) manteniendo una concentración de 90 mg/mL y se añadieron 100 µL de fluoruro de metil fenil sulfonilo (PMSF) (0,087 g de PMSF en 10 mL de etanol). La suspensión se sometió a una agitación vigorosa a 4°C durante 4 horas, y se centrifugó 45 minutos a 10.000 g. El sobrenadante se liofilizó y se conservó a -40° C hasta su utilización.

### **1.2.2.2. EXTRACTO DE PLACENTA HUMANA**

Se prepara según el método de Clark y col. (211) con algunas modificaciones (212-213). Las placentas se obtuvieron, tras el consentimiento correspondiente, de mujeres sanas y tras partos eutócicos a término.



Una vez eliminado el tejido fibroso las placentas se lavaron con suero fisiológico, para eliminar la mayor cantidad posible de sangre coagulada, se pesaron y trocearon y, en algunos casos, se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las diferentes etapas de la extracción se realizaron en cámara fría a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La placenta, fresca o previamente congelada, se homogeneiza en un homogeneizador de aspas (Moulinex, España) durante 15 minutos en "buffer" de homogeneización (Tris 50 mM, NaCl 120 mM, PMSF 1,5 mM, EDTA 1 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,02%), manteniendo una relación 1:4 (p/v). El homogeneizado se agitó durante 1 hora en dicho "buffer" para extraer los antígenos solubles. Posteriormente se centrifugó a 16.000 g durante 1 hora. El sobrenadante se dializó contra el mismo "buffer" durante toda la noche. Posteriormente se mezcló con dietilaminoetilcelulosa (DEAE-52, Whatman, England), 500 mg por gramo de tejido, previamente diluida en "buffer" de homogeneización. La mezcla se agitó suavemente durante 1 hora, y se lavó con el mismo "buffer" hasta no detectar proteína en el eluido. Las proteínas unidas a la resina se eluyeron mezclándola durante 1 hora con 650 mL de "buffer" de extracción (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, PMSF 0,1 mM, EDTA 1 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0,02%), en agitación suave. El eluido obtenido se dializó durante toda la noche contra acetato amónico 5 mM, se congeló y posteriormente se liofilizó y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en IB o CIE.

### 1.3. TECNICA DE ENZIMOINMUNOENSAYO

Las técnicas de ELISA se realizaron con sistemas comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante para cada ensayo (QUANTA LITE dsDNA, QUANTA LITE Histone, INOVA DIAGNOSTICS, San Diego, CA). Los antígenos, altamente purificados por el fabricante, proceden de timo de conejo y se adhieren a los pocillos de las placas de poliestireno en las condiciones necesarias para conservar el antígeno en estado nativo. Los sueros de los pacientes se diluyen 1:100 con el diluyente suministrado en el sistema. En cada ensayo se utilizan sueros control positivos y negativos, sin diluir, suministrados por el fabricante, así como controles positivos y negativos, procedentes de nuestro laboratorio, para control interno de la técnica. Todas las determinaciones se realizan por duplicado, colocando en cada pocillo 100  $\mu$ L de cada dilución, incubando la placa en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se lavan las placas tres veces con la solución de lavado del sistema, para eliminar los anticuerpos no unidos al antígeno, y se añaden en cada pocillo 100  $\mu$ L de anti-IgG humana marcada con peroxidasa, realizando una incubación de 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se realizan de nuevo tres lavados de la placa y se añaden 100  $\mu$ L de cromógeno en cada pocillo, incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasados los cuales se detiene la reacción con 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico 0,175 M. Finalmente, se leen las placas en un lector de ELISA Modelo 3550 (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA). Las densidades ópticas, medidas a 450 nm, se calculan teniendo en cuenta los valores de los pocillos "blanco" y realizando la media aritmética entre los duplicados. La conversión a unidades internacionales por mL se realizó en base a la densidad óptica

producida con el calibrador suministrado por el fabricante. Los valores de corte para determinar la positividad de los sueros, se establecieron en la media más tres desviaciones estandar de una serie de cincuenta sueros humanos normales.

#### **1.4. TECNICA DE "INMUNOBLOTTING"**

##### **1.4.1. PROCEDIMIENTO GENERAL**

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método de Laemmli (214), utilizando un sistema Mini Protean II cell (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA). El extracto a utilizar, a una concentración de 0,8 mg/mL, se diluye 1:1 en glicerol 10%, tris-HCl 25 mM, 2-mercaptoetanol 10% y dodecilsulfato de sodio (SDS) 2,5% (pH 6,8), se hierve durante 5 minutos y se centrifuga un minuto a 12.000 g. El sobrenadante se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida (T:18%) a 200 voltios durante 45 minutos, utilizando una solución salina de glicina 192 mM, tris-HCl 25 mM y SDS 0,1% (pH 8,3). Las proteínas desnaturalizadas se transfieren eléctricamente (100 voltios, 75 minutos) desde el gel a un papel de nitrocelulosa de 9 x 6,5 cm (Amersham, UK) en glicina 192 mM, tris-HCl 25 mM y metanol 20%, según el método de Towbin y cols (215). Una vez realizada la transferencia, se bloquea el papel con albúmina bovina 3% durante un mínimo de 12 horas.

El papel de nitrocelulosa se incuba durante 1 hora con sueros de referencia y sueros problema diluidos 1:5, utilizando un incubador múltiple 28X2 (Miniblotter II, Immunitics, Cambridge, MA).

Posteriormente, el papel de nitrocelulosa se lava en Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0,01% (pH 7,4) y se incuba durante un mínimo de 90 minutos con anti-IgG, (horseperoxidase-conjugated goat anti-human IgG, Nordic Laboratories, UK) diluida 1:1000 en la solución de lavado. La reacción se visualizó con 4-cloro 1-naftol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en etanol al 20% en agua destilada. Para detener la reacción de coloración, se lavó el papel de nitrocelulosa dos veces con agua destilada. Los pesos moleculares de los polipeptidos reconocidos por los anticuerpos detectados fueron calculados por comparación con proteínas de peso molecular conocido (Low Molecular Weight Standard, Pharmacia, Sweden). Las reacciones fueron leídas independientemente por dos observadores. En cada ensayo se utilizaron sueros control positivos de diferentes especificidades, así como suero humano normal como control negativo. Se consideró reacción positiva cuando el suero del paciente mostraba un patrón idéntico al de los sueros control positivos de referencia, y ambos observadores coincidían.

## **1.4.2. PREPARACION DE EXTRACTOS PARA TECNICA DE "INMUNOBLOTTING"**

### **1.4.2.1. EXTRACTO DE TIMO DE CONEJO**

El extracto de timo de conejo empleado en la técnica de IB se obtuvo según procedimiento descrito anteriormente en el apartado 1.2.2.1.

### **1.4.2.2. EXTRACTO DE PLACENTA HUMANA**

El extracto de placenta humana empleado en la técnica de IB se obtuvo según procedimiento descrito anteriormente en el apartado 1.2.2.2.

### **1.4.2.3. MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA**

Las mitocondrias de hígado de rata se obtuvieron por el procedimiento de Griffiths (216). Se sacrifican dos ratas "wistar" de 250 gr de peso, a las que se extrae el hígado. Se colocan los hígados en un recipiente sobre hielo picado y se lavan repetidas veces con "buffer" de homogenización (sacarosa 200 mM, Hepes-NaOH 10 mM, pH 7.4). Se cortan en trozos pequeños y se homogeneizan en 120 mL del "buffer" descrito, en un homogeneizador tipo Potter (Braun Biotech S.A., España) a 800 r.p.m., con cinco pasadas de 10 segundos. Se centrifuga a 2.000 g

durante 15 minutos, recogiénose el sobrenadante. Tras retirar cuidadosamente la capa de lípidos de la parte superior, se completó hasta 250 mL con el mismo "buffer", centrifugando durante 10 minutos a 9.000 g. Se deshecha el sobrenadante y se completa hasta 80 mL, repitiendo la centrifugación dos veces más. Se resuspende en "buffer", para conseguir una concentración proteica final de entre 80 y 100 mg/mL.

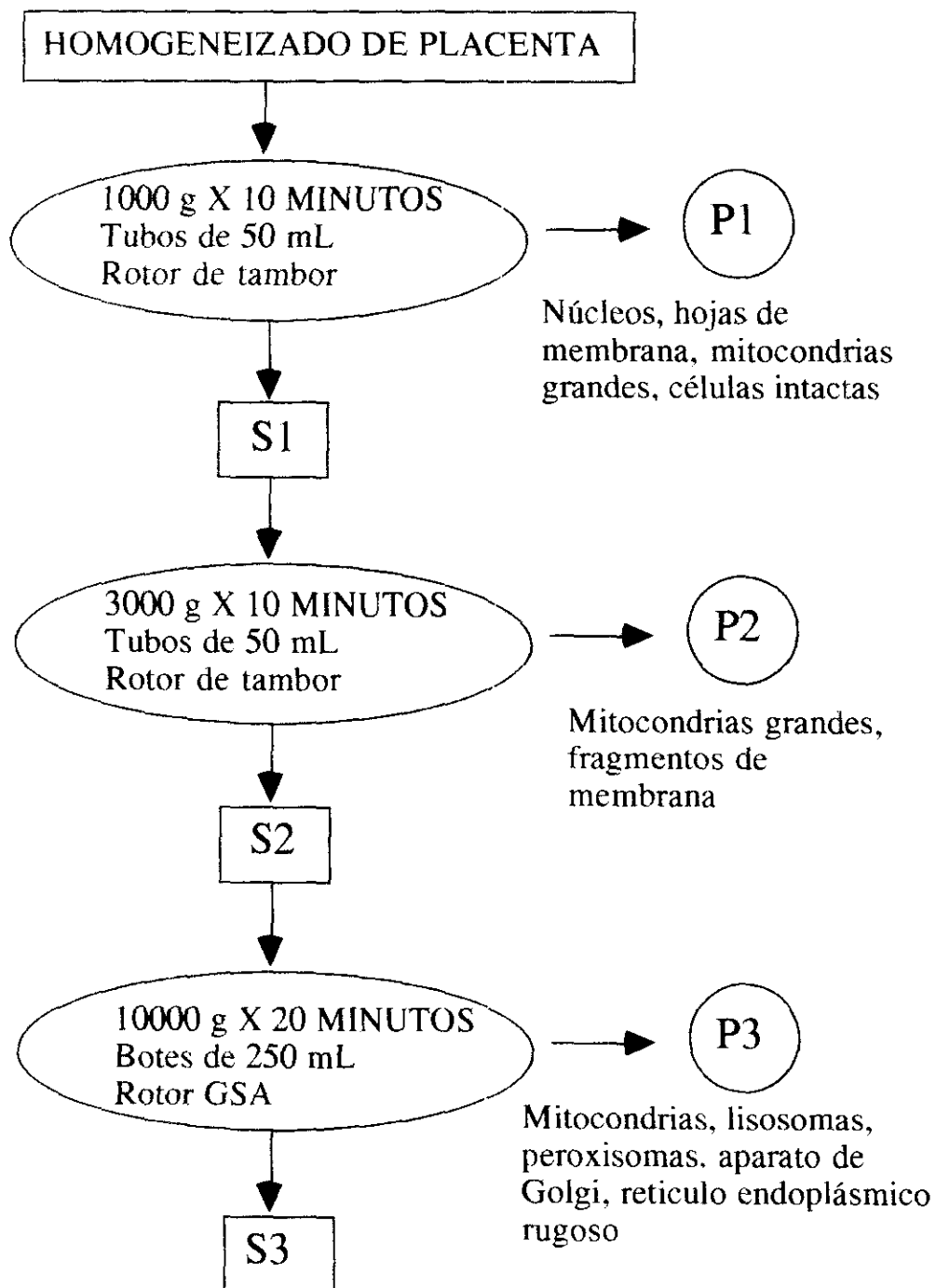
#### **1.4.2.4. FRACCIONES CELULARES DE PLACENTA HUMANA**

Las fracciones celulares se obtuvieron mediante el protocolo de centrifugación diferencial de Graham (217), mostrado esquemáticamente en la figura 2. Se obtiene una placenta humana fresca y se procesa para su limpieza siguiendo la metodología anteriormente descrita. Se homogeneiza en "buffer" de homogeneización (Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, sacarosa 0.25 M, sulfato de magnesio 1 mM, cloruro cálcico 1 mM y PMSF 1 mM), utilizando un homogeneizador de aspas (Moulinex, España), durante 10 minutos a 4°C y filtrando posteriormente a través de dos gasas.

Se centrifuga el homogeneizado a 1.000 g durante 10 minutos en tubos de 50 mL, utilizando un rotor de tambor modelo SS-34 en una centrífuga Sorvall RC-5B. De esta forma se obtiene un "pellet" (P1), que contiene principalmente material nuclear, y un sobrenadante (S1) que posteriormente se centrifuga a 3.000 g durante 10 minutos en tubos de 50 mL y con idéntico rotor. Así se obtiene un segundo "pellet" (P2), que contiene, en su mayoría, mitocondrias y fragmentos de membrana plasmática (fracción de mitocondrias). El sobrenadante (S2) se centrifuga

a 10.000 g durante 20 minutos en botes de 250 mL utilizando un rotor GSA. Se obtiene así un tercer "pellet" (P3), constituido por mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, microsomas y peroxisomas. Finalmente se obtiene un sobrenadante (S3). Todos los extractos son posteriormente liofilizados, utilizando un concentrador - liofilizador modelo Speed-Vac liofilization chamber (Savant), hasta su utilización para la técnica de IB.

**Figura 2.- Preparación de fracciones celulares de placenta humana mediante centrifugación diferencial.**



Microsomas de retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, fracción soluble.



## **1.5. ENSAYOS DE ADSORCION**

En todos los ensayos de adsorción se utilizaron aquellos sueros de pacientes con AR que, mediante técnica de IFI, habían dado fluorescencia de patrón anular sincitial sobre placenta humana a una dilución 1/20.

### **1.5.1. ADSORCION CON ANTIGENO SA PURIFICADO**

El antígeno Sa purificado fue suministrado por la Dra. Escalona. Para su obtención se siguió un procedimiento basado en cromatografía de afinidad a partir de fracción mitocondrial de placenta humana (207). Se incubaron 100  $\mu$ L de antígeno Sa, a concentraciones de 1, 2, 5 y 10  $\mu$ g/mL, con 100  $\mu$ L de los sueros de los pacientes diluidos 1:3 con PBS, durante 48 horas a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron a 1.500 g durante 20 minutos y se recogieron los sobrenadantes, que fueron empleados a continuación en técnica de IFI.

### **1.5.2. ADSORCION CON FRACCION DE MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA**

La adsorción de los sueros de los pacientes utilizando fracción de mitocondrias de placenta humana, se realizó según el siguiente procedimiento. Los sueros a adsorber se diluyeron 1/3 con PBS y se incubaron 100  $\mu$ L de la dilución, con 100  $\mu$ L de fracción de mitocondrias de placenta humana, a una concentración proteica de 25 mg/mL, durante

48 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 1.500 g durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante, el cual se sometió a otras dos etapas sucesivas de adsorción durante 24 horas cada una, a 4°C. Tras cada una de las etapas de adsorción se recogieron los sobrenadantes resultantes, quedando por tanto el suero original a diluciones finales de 1/6, 1/12 y 1/24 en cada uno de los sobrenadantes. Como control del procedimiento, también fue sometido a adsorción con la fracción mitocondrial de placenta humana, en una sólo etapa, un suero con una especificidad anti-mitocondrial (M2) determinada mediante IFI sobre sustrato de tejidos de rata y confirmado mediante técnica de ELISA, utilizado a una dilución inicial 1/50. Los sueros de los pacientes, una vez sometidos al procedimiento de adsorción, fueron utilizados nuevamente en la técnica de IFI.

### **1.5.3. ADSORCION CON SUBFRACCIONES MITOCONDRIALES**

#### **1.5.3.1. OBTENCION DE SUBFRACCIONES MITOCONDRIALES**

El fraccionamiento de las mitocondrias de placenta humana se realizó mediante tratamiento con detergentes de la fracción mitocondrial obtenida según el método anterior, y posterior separación llevada a cabo por ultracentrifugación diferencial, cuyas fases se muestran esquemáticamente en la figura 3.

Las mitocondrias fueron tratadas con digitonina siguiendo el procedimiento de Schnaitman (218). Inicialmente, la solución de digitonina se purifica según el método de Kun (219). Para ello, se disuelve 1 gr de digitonina en 25 mL de etanol absoluto a 75°C, con agitación continua. La solución se deja precipitar durante 20 minutos a 4°C y se separa el sobrenadante por centrifugación a la misma temperatura. El sedimento, conteniendo la digitonina purificada, se seca posteriormente al vacío utilizando un concentrador-lioofilizador modelo Speed-Vac liofilization chamber (Savant)

A continuación, se prepara una solución de digitonina al 2% añadiendo a la digitonina purificada "buffer" de homogeneización previamente calentado (sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM en "buffer" fosfato 25 mM), agitando vigorosamente y sonicando durante 1-2 minutos en un baño ultrasónico. La solución de digitonina se añade gota a gota a la suspensión de mitocondrias, en agitación continua a 4°C, hasta obtener una concentración de 1,2 mg de digitonina por cada 10 mg de proteína mitocondrial. Inmediatamente después, se ajusta la concentración de proteínas mitocondriales a 50 mg/mL y se incuba a 4°C durante 20 minutos en agitación continua.

La fracción mitocondrial tratada con digitonina se diluye en 3 volúmenes de "buffer" de homogeneización frío y se utiliza esta solución para iniciar la centrifugación diferencial según el método descrito por Soper y Pedersen (220). El primer paso del procedimiento consiste en una centrifugación a 23.600 g durante 20 minutos, utilizando un rotor SS-34 en una centrífuga Sorvall RC-5B, obteniéndose un sedimento con

mitoplastos (mitocondrias carentes de membrana externa), y un sobrenadante (membrana externa y espacio intermembranoso).

La subfracción de mitoplastos se resuspende en el mismo "buffer" de homogeneización y se centrifuga durante 20 minutos a 23.600 g, desechando el sobrenadante. Después, se somete a otra centrifugación a 3.000 g y se elimina el sedimento resultante. Finalmente, se repite la operación centrifugando durante 20 minutos a 23.600 g durante 20 minutos, desechándose de nuevo el sobrenadante. El sedimento de la última centrifugación contiene mitoplastos purificados (subfracción de mitoplastos).

El sobrenadante obtenido tras el tratamiento con digitonina y la primera centrifugación, compuesto por la membrana externa y el espacio intermembranoso, se trata de la forma descrita a continuación. Se centrifuga a 40.000 g durante 20 minutos para eliminar los restos de membrana interna fragmentada, desechando por tanto el sedimento. El sobrenadante resultante se centrifuga a 144.000 g durante 60 minutos, utilizando un rotor 42.1 y una ultracentrífuga modelo L8-70 (BECKMAN). De esta forma, el sedimento está constituido por las vesículas de membrana externa (subfracción membrana externa) y el sobrenadante contiene los constituyentes del espacio intermembranoso (subfracción espacio intermembranoso). El sedimento se resuspende en mínimo volumen del "buffer" de homogeneización. Ambas subfracciones se congelan a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La subfracción de mitoplastos anteriormente obtenida y conservada a  $4^{\circ}\text{C}$ , se somete a la acción del lubrol WX mediante el siguiente

procedimiento. La solución "stock" de lubrol al 4% en agua destilada se añade gota a gota y bajo agitación continua a 40°C, hasta obtener una concentración de 1 mg de lubrol por cada 10 mg de proteína mitocondrial. Se ajusta la concentración de proteína mitocondrial a 35 mg/mL y se incuba durante 20 minutos a 40°C. Se diluye la suspensión con igual volumen de "buffer" y se centrifuga a 144.000 g durante 60 minutos, utilizando una ultracentrífuga modelo L8-70 (BECKMAN). De esta forma, se obtiene un sobrenadante compuesto por el contenido de la matriz mitocondrial (subfracción matriz), y un sedimento compuesto por vesículas de la membrana interna mitocondrial. Se separan ambos y el sedimento es resuspendido en el mismo "buffer" utilizado, centrifugando a 4.300 g durante 10 minutos, descartándose el sedimento. El sobrenadante de esta última centrifugación se centrifugó de nuevo a 144.000 g durante 60 minutos y se resuspende en el mínimo volumen de "buffer" (subfracción membrana interna). Ambas subfracciones se conservaron a -40°C hasta su utilización.

Por tanto, después del procedimiento, se obtuvieron 4 subfracciones, numeradas de la siguiente forma :

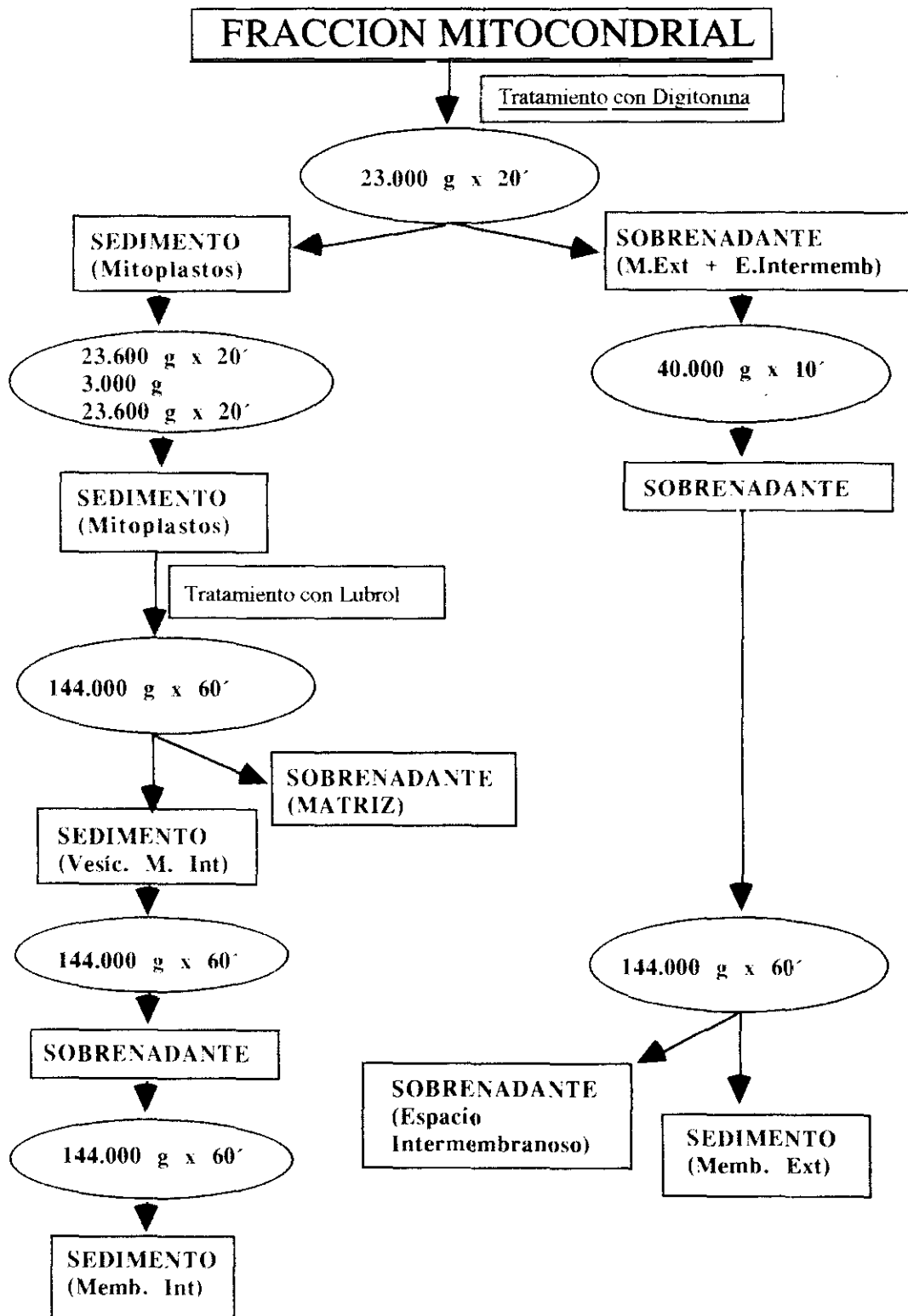
- 1) Membrana externa
- 2) Espacio intermembranoso
- 3) Membrana interna
- 4) Matriz mitocondrial

Todas las subfracciones se ajustaron a una concentración proteica de 12 mg/mL.

### 1.5.3.2. PROCEDIMIENTOS DE ADSORCION

Los procedimientos de adsorción se realizaron mediante el mismo sistema descrito en el apartado 1.5.2., utilizando por separado las subfracciones mitocondriales correspondientes a la matriz mitocondrial, membrana interna, membrana externa y espacio intermembranoso. Las subfracciones mitocondriales se utilizaron a la concentración de 12 mg/mL. Los sueros de los pacientes, una vez sometidos a los procedimientos de adsorción, se utilizaron nuevamente en la técnica de IFI. Asimismo, se utilizó como control de los procedimientos de adsorción el mismo suero del paciente con anticuerpos antimitocondria (M2).

**Figura 3.- Preparación de subfracciones mitocondriales de placenta humana mediante centrifugación diferencial.**



## 2. MUESTRAS ESTUDIADAS

### 2.1. SUEROS DE PACIENTES CON AR

Los sueros de los 94 pacientes incluidos en el estudio proceden de la seroteca de los Servicios de Inmunología y Reumatología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" de Madrid (Unidad de Medicina y Cirugía Experimental).

Todos los pacientes habían sido previamente diagnosticados de AR en base a los datos clínicos, biológicos y radiológicos característicos de la enfermedad, utilizándose los criterios comúnmente aceptados para el diagnóstico (194). Setenta y cuatro pacientes son mujeres. La edad media es 57,78 años (desviación estándar, SD = 12,28; rango 29-81 años) y el tiempo medio de evolución 8,68 años (SD = 8,56; rango 0-40 años). La distribución por edades y tiempo de evolución de la enfermedad se detalla en las tablas VI y VII, respectivamente.

**TABLA VI. DISTRIBUCION DE LOS 94 PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ARTRITIS REUMATOIDE POR GRUPOS DE EDAD**

<b>INTERVALO DE EDAD (años)</b>	<b>NUMERO DE PACIENTES</b>	<b>PORCENTAJE</b>
20-29	1	1,06 %
30-39	8	8,51 %
40-49	15	15,96 %
50-59	22	23,40 %
60-69	35	37,23 %
70-79	12	12,77 %
≥ 80	1	1,06 %



**TABLA VII. DISTRIBUCION DE LOS 94 PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ARTRITIS REUMATOIDE POR TIEMPO DE EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD**

TIEMPO DE EVOLUCION (años)	NUMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE
0-5	39	41,49 %
5-10	22	23,40 %
10-15	15	15,96 %
15-20	7	7,45 %
20-25	5	5,32 %
≥25	6	6,38 %

Los datos clínicos de los pacientes fueron obtenidos en el momento del diagnóstico y a lo largo de su evolución, siendo evaluados periódicamente en el Servicio de Reumatología del Hospital "Gregorio Marañón" de Madrid. Las manifestaciones extraarticulares observadas en el grupo de pacientes se resumen en la tabla VIII.

**TABLA VIII. MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

MANIFESTACIONES CLINICAS	NUMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE
Afección cutánea	3	3,2 %
Síndrome de Sjögren	25	26,6 %
Afección pulmonar	9	9,6 %
Afección cardíaca	3	3,2 %
Afección SNC	7	7,4 %
Afección hepática	14	14,9 %
Afección renal	10	10,6 %
Anemia	50	53,2 %
Linfopenia	13	13,8 %

El estadiaje de la afección articular de los pacientes estudiados se realizó de acuerdo con los criterios de la clasificación de progresión de AR (221) (Tabla IX)

**Tabla IX. Criterios para el estadiaje de la afección articular de pacientes con artritis reumatoide**

**Estadio I (AR precoz)**

- (\*)No alteraciones destructivas en el examen radiológico.
- Puede existir evidencia radiológica de osteoporosis.

**Estadio II (AR moderada)**

- (\*)Evidencia radiológica de osteoporosis, con o sin destrucción ósea subcondral ligera.
- (\*)No deformidad articular, aunque puede existir limitación de movilidad articular.
- Atrofia de los músculos adyacentes a la articulación.
- Pueden existir lesiones de los tejidos blandos extraarticulares (nódulos, tenosinovitis).

**Estadio III (AR grave)**

- (\*)Evidencia radiológica de destrucción ósea y cartilaginosa, además de osteoporosis.
- (\*)Deformidad articular manifestada como subluxación, desviación ulnar o hiperextensión, sin anquilosis fibrosa u ósea.
- Atrofia muscular extensa.
- Pueden existir lesiones de los tejidos blandos extraarticulares (nódulos, tenosinovitis).

**Estadio IV (AR terminal)**

- (\*)Anquilosis fibrosa u ósea.
- Criterios del estadio III.

**Los criterios señalados con un asterisco (\*) deben estar presentes para permitir la clasificación del paciente en un estadio concreto.**

El estadio funcional de los pacientes se obtuvo de acuerdo con los criterios revisados del Colegio Americano de Reumatología (222) (tabla X).

**Tabla X. Criterios para la clasificación del estadio funcional en pacientes con artritis reumatoide**

**Clase I**

El paciente es totalmente capaz de realizar sus actividades de la vida diaria (autocuidados, actividades laborales y actividades recreativas).

**Clase II**

El paciente puede realizar actividades de autocuidado y laborales, pero se encuentra limitado en sus actividades recreativas.

**Clase III**

El paciente puede realizar actividades de autocuidado, encontrando limitación en sus actividades laborales y recreativas.

**Clase IV**

El paciente se encuentra limitado en sus actividades de autocuidado, laborales y recreativas.

-Actividades de autocuidado : vestirse, alimentarse, bañarse, acicalamiento y aseo.

-Actividades laborales : trabajo, colegio, tareas del hogar.

-Actividades recreativas : ocio, entretenimiento

La clasificación de los pacientes estudiados en base a su grado de afectación articular, desde el punto de vista de criterios radiológicos y funcionales, se especifica en la tabla XI.

**TABLA XI. ESTADIOS RADIOLOGICOS ARTICULARES Y FUNCIONALES DE LOS 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

GRADO DE AFECTACION	ESTADIO RADIOLOGICO		ESTADIO FUNCIONAL	
	N	(%)	N	(%)
I	26	(27,66 %)	39	(41,49 %)
II	29	(30,85 %)	31	(32,98 %)
III	16	(17,02 %)	18	(19,15 %)
IV	23	(24,47 %)	6	(6,38 %)

## 2.2. SUEROS DE REFERENCIA Y CONTROLES

Los sueros de referencia positivos anti-nRNP, anti-Sm, anti-Ro y anti-La proceden del Center for Disease Control (CDC) de Atlanta (Georgia, EE.UU) (223). Los sueros de referencia anti-Sa provienen del laboratorio de Inmunorreumatología del Centro Hospitalario de la Universidad de Sherbrooke (Quèbec, CANADA). Finalmente, se han utilizado sueros con anticuerpos anti-ADN nativo, antimitocondriales, anti-músculo liso y antinucleares procedentes del laboratorio de Autoinmunidad del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" de Madrid.

Como controles negativos se han utilizado cincuenta sueros de donantes sanos procedentes del Banco de Sangre del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" de Madrid.

### **3. ANALISIS ESTADISTICO**

Los datos generados durante el estudio fueron procesados mediante un ordenador personal Apple Macintosh dotado de microprocesador Motorola 68030 a 33 megahertzios y coprocesador matemático modelo 68882. El análisis se efectuó mediante el paquete estadístico Statview versión 4.0 (Abacus Concepts Inc, Berkeley, CA). Se utilizaron diversas técnicas estadísticas según fuera apropiado, tales como el test de la t de Student no pareada, la prueba de chi cuadrado, con corrección de Yates, y el test exacto de Fisher. En determinados casos se calculó la razón de predominio ("odds ratio", OR) y el intervalo de confianza del 95% (IC95%). Se consideró estadísticamente significativo todo valor de  $p$  ó  $\alpha$  (test de Fisher) inferior a 0,05.

## RESULTADOS

### 1. RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES TECNICAS DE ESTUDIO DE AUTOANTICUERPOS

#### 1.1. RESULTADOS OBTENIDOS CON TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

##### 1.1.1. IFI SOBRE HIGADO, RIÑON Y ESTOMAGO DE RATA

Se detectaron anticuerpos antinucleares en 53 de los 94 sueros estudiados (56,4%). Cinco sueros (5,3%) mostraron tinción de fluorescencia sobre las células parietales gástricas. Tres sueros (3,2%) presentaron anticuerpos anti-músculo liso patrón vascular (V), y un suero (1,1%) presentaba un patrón citoplasmático anti-mitocondrial (M2) (tabla XII).

**TABLA XII. PATRONES DE FLUORESCENCIA ENCONTRADOS POR IFI SOBRE TEJIDOS DE RATA EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

ESPECIFICIDADES	NUMERO DE PACIENTES (%)
Anticuerpos antinucleares	53 (56,4%)
Anticuerpos anti-células parietales gástricas	5 (5,3%)
Anticuerpos anti-músculo liso	3 (3,2%)
Anticuerpos antimitocondria (M2)	1 (1,1%)

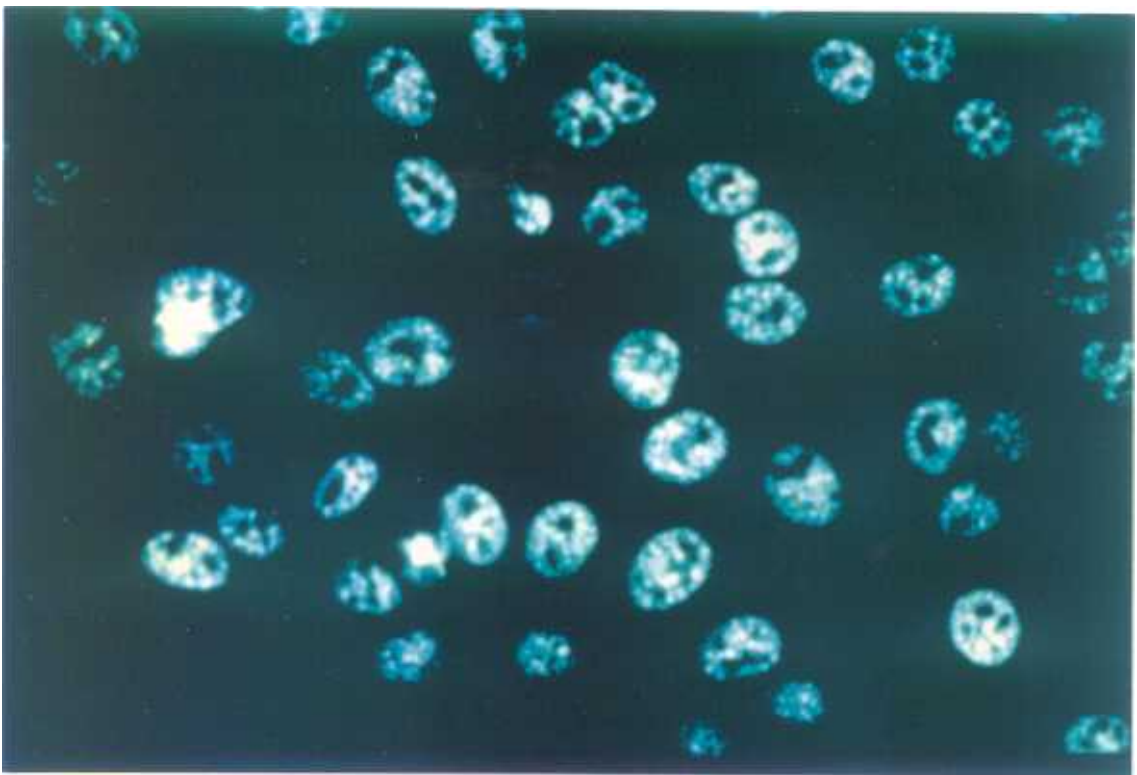
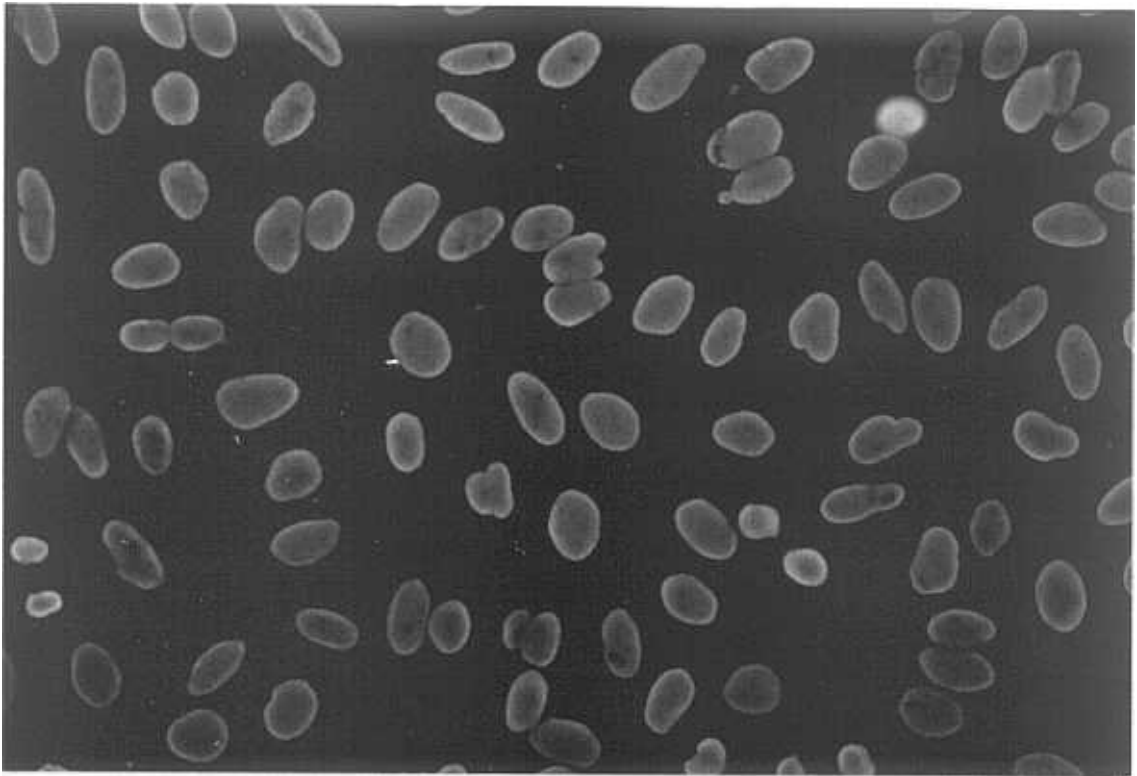
Sobre tejidos de rata no se encontró ningún patrón citoplasmático correspondiente a autoanticuerpos de especificidad no conocida.

### 1.1.2. IFI SOBRE SUSTRATO DE CELULAS TUMORALES HEP-2

Sobre este sustrato se observaron anticuerpos antinucleares en 53 pacientes (56,4%), correspondiendo a los mismos pacientes detectados sobre el anterior sustrato. De ellos, 41 presentaron un patrón de fluorescencia homogéneo puro, 7 patrón granular puro y 5 mostraron un patrón mixto (homogéneo-granular) (figura 4). Los resultados de la IFI sobre células HEP-2 se resumen en la tabla XIII. Se detectó además un patrón de fluorescencia citoplasmático en uno de los pacientes de la serie, el cual sobre tejidos de rata daba el patrón antimitocondria (M2).

**TABLA XIII. PATRONES DE INMUNOFLUORESCENCIA MEDIANTE IFI SOBRE CELULAS HEP-2 EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

<b>PATRON ANA</b>	<b>NUMERO DE PACIENTES</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Homogéneo</b>	<b>41</b>	<b>43,6%</b>
<b>Granular</b>	<b>7</b>	<b>7,4%</b>
<b>Mixto (H-G)</b>	<b>5</b>	<b>5,3%</b>



**Figura 4. IFI sobre sustrato de células tumorales HEp-2**

a : ANA patrón homogéneo (Microscopio de fluorescencia, 40X)

b : ANA patrón granular (Microscopio de fluorescencia, 40X)



En cuanto a los títulos de los anticuerpos antinucleares encontrados sobre este sustrato, los resultados se resumen en la tabla XIV. En conjunto, el 31,9% de los pacientes presentaron títulos bajos de ANA (1/40 y 1/80), siendo el título igual o superior a 1/160 en el 24,5% de pacientes.

**TABLA XIV . TITULOS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES DETECTADOS SOBRE CELULAS HEP-2 EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

TITULO	NUMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE
1/40	10	10,6%
1/80	20	21,3%
1/160	6	6,4%
1/320	6	6,4%
1/640	8	8,5%
1/1280	1	1,1%
1/2560	2	2,1%

Sobre células HEP-2 no se encontró ningún patrón citoplasmático correspondiente a autoanticuerpos de especificidad no conocida.

### 1.1.3. IFI SOBRE TEJIDOS DE MONO

Elegimos 8 sueros de pacientes con AR, que habían dado un patrón anti-Sa por la técnica de IB, para testarlos en los sustratos de mono (adrenal, tiroides y pancreas). Se utilizaron 8 sueros de pacientes con AR como control anti-Sa negativo. En los tres tipos de sustratos, ningún suero

(anti-Sa positivo o negativo) mostró una tinción de fluorescencia citoplasmática en las células de los tejidos empleados, detectándose exclusivamente anticuerpos antinucleares.

#### **1.1.4. IFI SOBRE NEUTROFILOS HUMANOS**

Se observó un patrón de fluorescencia tipo P-ANCA en 14 de los 94 sueros del estudio (14,9%). En ninguno de los sueros se detectó el patrón C-ANCA. Asimismo no se observaron tinciones de fluorescencia correspondientes a especificidades no identificadas.

#### **1.1.5. IFI SOBRE HIGADO HUMANO**

Se testaron los 94 sueros de pacientes con AR sobre este sustrato. Los resultados revelan el mismo porcentaje de anticuerpos antinucleares ya citado anteriormente sobre sustrato de tejidos de rata. Asimismo se detectó un patrón granular citoplasmático, correspondiente al suero que contenía anticuerpos antimitocondria (M2). No se observaron patrones de fluorescencia correspondientes a especificidades no identificadas.

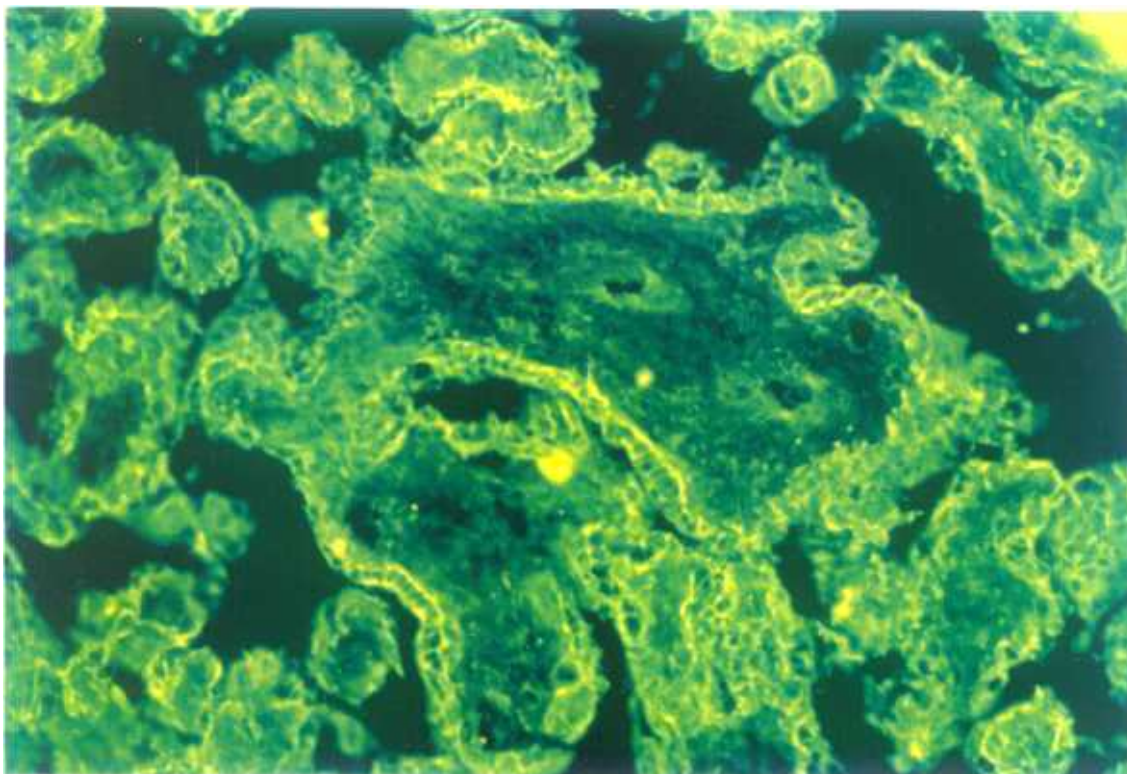
#### **1.1.6. IFI SOBRE PLACENTA HUMANA**

Se testaron los 94 sueros del estudio sobre este sustrato, observándose un resultado positivo en 48 (51,1%). Las preparaciones de placenta humana consideradas positivas por IFI mostraron un patrón de

fluorescencia que se caracteriza por una tinción continua en la zona periférica de las vellosidades coriónicas, correspondiente al sincitiotrofoblasto. La tinción se distribuye por el citoplasma del sincitio, respetando los núcleos, que aparecen oscuros (en ausencia de anticuerpos antinucleares). Esta tinción de fluorescencia dibuja una serie de anillos a lo largo del sincitiotrofoblasto, por lo que la hemos denominado patrón anular sincitial (figura 5).

#### **1.1.7. IFI SOBRE SUSTRATO DE CELULAS TUMORALES JAR**

Se examinaron 40 sueros sobre este sustrato, correspondientes a 20 sueros anti-Sa positivos por IB y otros 20 sueros anti-Sa negativos por IB. Los 20 sueros anti-Sa positivos mostraron 11 patrones homogéneos, 2 granulares y 1 mixto sobre este sustrato, mientras los sueros anti-Sa negativos dieron 8 patrones homogéneos, 1 granular y 1 mixto sobre células JAR. Se observó una buena correlación entre los patrones de fluorescencia nuclear detectados en este sustrato y los patrones observados en los mismos sueros, testados sobre células HEP-2. Asimismo no se detectó en este sustrato ningún patrón de fluorescencia citoplasmático correspondiente a especificidades no identificadas.



**Figura 5. IFI sobre sustrato de placenta humana a termino.**

(Microscopio de fluorescencia, 20X)

Observe la tinción citoplasmática del sincitiotrofoblasto, adoptando el patrón de fluorescencia "anular sincitial", característico de los anticuerpos anti-Sa.

El uso de células JAR estimuladas con diferentes agentes (dibutiril-AMPc (0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM), teofilina (0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM), phytohemaglutinina (1 mg/mL y 10 mg/mL) y PMA (10 mg/mL y 50 mg/mL)), no mostró ninguna modificación en los resultados, con respecto a los hallados en la línea celular JAR sin estímulos.

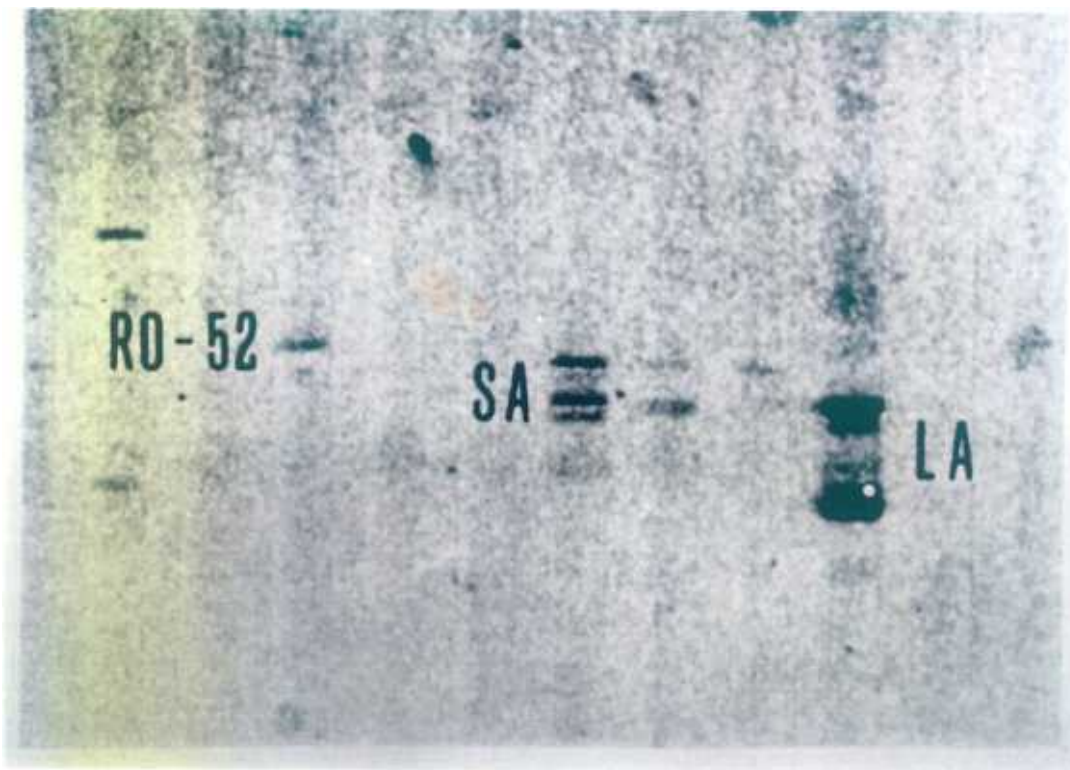
## **1.2. RESULTADOS OBTENIDOS CON TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS**

El estudio de los 94 sueros de pacientes con AR permitió detectar un total de 4 sueros positivos (4,2%) para anti-Ro mediante esta técnica utilizando extracto de placenta, no observándose ninguna otra línea de precipitación debida a otras especificidades. La CIE realizada con extracto de timo no detectó otras especificidades.

## **1.3. RESULTADOS OBTENIDOS CON TECNICA DE "INMUNOBLOTTING"**

### **1.3.1. DETECCION DE ANTI-SA MEDIANTE TECNICA DE IB CON EXTRACTO DE PLACENTA HUMANA**

De los 94 pacientes estudiados, 54 (57,4%) mostraron la presencia de anti-Sa mediante técnica de IB. El patrón típico anti-Sa consiste en la aparición de tres bandas de un peso molecular aparente entre 48 y 36 KD (figura 6).



**Figura 6. IB con extracto de placenta humana a termino.**

Izquierda : Patrón característico de los anticuerpos anti-Ro 52 KD.

Centro : Patrón característico de los anticuerpos anti-Sa.

Derecha : Patrón característico de los anticuerpos anti-La.

### 1.3.2. OTROS AUTOANTICUERPOS DETECTADOS MEDIANTE TECNICA DE "INMUNOBLOTTING"

Mediante IB con extracto de placenta humana, se identificaron 10 sueros (10,6%) en los que se observaba la banda de 60 KD de la partícula Ro. En dos de estos pacientes (2,1%) se observaba además la banda de 52 KD de la partícula Ro. En un suero se observaba además el patrón correspondiente a los anticuerpos anti-SSB/La.

En el IB con extracto de timo de conejo sólo se halló un paciente que presentaba un doblete BB'. Los resultados de los hallazgos de la técnica de IB con los diferentes extractos empleados se resumen en la tabla XV.

**TABLA XV. RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE TECNICA DE "INMUNOBLOTTING" EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

EXTRACTO UTILIZADO	ANTICUERPOS	NUMERO DE PACIENTES (%)
PLACENTA HUMANA	Anti-Sa	54 (57,4%)
	Anti-Ro (60 KD)	10 (10,6%)
	Anti-Ro (52 KD)	2 (2,1%)
	Anti-La	1 (1,1%)
TIMO DE CONEJO	Anti-BB'	1 (1,1%)

#### **1.4. RESULTADOS OBTENIDOS CON TECNICA DE ENZIMOINMUNOENSAYO**

De los 94 sueros estudiados, se detectaron 33 sueros positivos (35,1%) para anticuerpos antihistonas, y 34 sueros (36,2%) con anticuerpos anti-ADN nativo. De los sueros positivos, 13 (13,8%) presentaban reactividad tanto para anticuerpos antihistonas como para anti-ADN nativo.



## **2. ESTUDIO DE LAS CORRELACIONES ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE DIFERENTES TECNICAS DE DETERMINACION DE AUTOANTICUERPOS Y EL "INMUNOBLOTTING" COMO TECNICA DE REFERENCIA**

### **2.1. TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA**

#### **2.1.1. TEJIDOS DE RATA**

No se observó correlación estadística entre los patrones de fluorescencia citoplasmáticos encontrados sobre estos sustratos y la presencia de anticuerpos anti-Sa detectados por IB, debido al reducido número de pacientes que presentaron algún tipo de patrón citoplasmático.

#### **2.1.2. CELULAS TUMORALES HEp-2**

No se detectó una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos anti-Sa por IB y la aparición de determinado patrón de fluorescencia nuclear con IFI sobre células tumorales. Así, se hallaron 41 pacientes con anticuerpos antinucleares positivos y patrón homogéneo sobre este sustrato, de los cuales 24 eran positivos para anticuerpos anti-Sa por IB y 17 eran negativos ( $\chi^2 = 0$ ;  $p > 0,99$ ;  $\alpha > 0,99$ ). Se hallaron 7 pacientes con anticuerpos antinucleares positivos y patrón granular, de los cuales 3 eran positivos para anticuerpos anti-Sa por IB y 4 eran negativos ( $\chi^2 = 0,172$ ;  $p = 0,678$ ;  $\alpha = 0,453$ ). Finalmente, los 5 sueros con anticuerpos antinucleares positivos y patrón mixto sobre células HEp-

2, correspondían a 3 pacientes positivos para anticuerpos anti-Sa por IB y 2 negativos ( $\chi^2 = 0$ ;  $p > 0,99$ ;  $\alpha > 0,99$ ). (Tabla XVI).

**TABLA XVI. RELACION ENTRE PATRONES DE INMUNOFUORESCENCIA SOBRE CELULAS HEP-2 Y ANTI-SA DETECTADO POR "INMUNOBLOTTING" EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

PATRON IFI	N = 54	N = 40	p*	$\alpha^{**}$
	IB ANTI-SA(+) n (%)	IB ANTI-SA(-) n (%)		
Homogéneo	24 (44,4%)	17 (42,5%)	NS	NS
Granular	3 (5,6%)	4 (10,0%)	NS	NS
Mixto (H-G)	3 (5,6%)	2 (5,0%)	NS	NS

\* Test de Chi cuadrado con corrección de Yates

\*\* Test exacto de Fisher

NS : No significativo

Analizando el título de anticuerpos antinucleares determinado mediante este sustrato, se observa una correlación estadísticamente significativa entre un título de ANA superior a 1/160 y los anticuerpos anti-Sa detectados por IB. Así, de los 30 pacientes con anticuerpos anti-Sa por IB y ANA positivos, 17 (56,6%) presentaban título de ANA igual o superior a 1/160, mientras que, de los 23 pacientes sin anticuerpos anti-Sa por técnica de IB y ANA positivos, 6 (26,1%) presentaban título de ANA igual o superior a 1/160 ( $\chi^2 = 3,789$ ;  $\alpha = 0,0492$ ). Si se consideran exclusivamente los pacientes con patrón homogéneo de fluorescencia sobre células HEP-2, que es el mayoritario en nuestro grupo de pacientes, se observa una tendencia en el mismo sentido, puesto que de los 24

pacientes con anticuerpos anti-Sa por IB y ANA positivos de patrón homogéneo, 14 (58,3%) presentaban ANA a título igual o superior a 1/160, frente a 4 de los 17 pacientes sin anticuerpos anti-Sa por técnica de IB y ANA positivos de patrón homogéneo (23,5%), bordeando el límite de significación estadística ( $\chi^2 = 3,583$ ;  $\alpha = 0,0539$ ). (Tabla XVII).

**TABLA XVII. RELACION ENTRE TITULOS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR IFI SOBRE CELULAS HEP-2 Y ANTI-SA DETECTADO POR "INMUNOBLOTTING" EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

TITULO ANA	PACIENTES ANA (+)		PACIENTES ANA(+) PATRON HOMOGENEO	
	IB Sa (-)	IB Sa (+)	IB Sa (-)	IB Sa (+)
<1/160	17	13	13	10
≥1/160	6	17	4	14
$\alpha^*$	0,049		NS	

\* Test exacto de Fisher

NS : No significativo

### 2.1.3. SUSTRATO DE NEUTROFILOS HUMANOS

De los 54 sueros positivos para anticuerpos anti-Sa por IB, 11 (20,4%) presentaron patrón de fluorescencia P-ANCA en IFI sobre neutrófilos humanos, frente a 3 P-ANCA encontrados entre los 40 pacientes con anticuerpos anti-Sa negativos por técnica de IB (7,5%) no

observándose por tanto asociación entre ambas especificidades ( $\text{Chi}^2 = 2,073$ ;  $p=0,1499$ ).

#### 2.1.4. SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA

Se observa una correlación altamente significativa entre el patrón de fluorescencia anular sincitial detectado mediante IFI sobre placenta humana, y anticuerpos anti-Sa detectados por IB. De los 54 sueros con anticuerpos anti-Sa en IB, 39 mostraron un patrón anular sincitial en IFI, mientras que de los 40 sueros sin anticuerpos anti-Sa por IB, 31 no mostraron el patrón anular sincitial por la técnica de IFI. ( $\text{Chi}^2 = 20,788$ ;  $p < 0,0001$ ;  $\text{OR}=8,96$   $\text{IC}95\%$  (3,64-22,05);  $\alpha < 0,0001$ ). (Tabla XVIII).

**TABLA XVIII. ANTICUERPOS ANTI-SA DETECTADOS MEDIANTE "INMUNOBLOTTING" Y CORRELACION CON PATRON ANULAR SINCICIAL POR IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

	N = 54		N = 40		TOTAL
	IB ANTI-SA(+)		IB ANTI-SA(-)		
	N	(%)	N	(%)	
IFI-PLACENTA PATRON ANULAR SINCICIAL	39	(41,5%)	9	(9,6%)	48 (51,1%)
IFI-PLACENTA NEGATIVA	15	(15,9%)	31	(33,0%)	46 (48,9%)

$\text{Chi}^2 : 20.788. p < 0,0001$  OR : 8,96. IC 95% : 3,64 - 22,05.  
 $\alpha < 0.0001$  (Test exacto de Fisher)

## 2.2. TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Los 4 sueros positivos para anticuerpos anti-Ro por CIE con extracto de placenta humana fueron también positivos para anticuerpos anti-Sa por IB. Sin embargo, no se demostró una correlación estadísticamente significativa ( $\text{Chi}^2 = 1,544$ ;  $p = 0,2141$ .  $\alpha = 0,1337$ ).

## 2.3. TECNICA DE ENZIMOINMUNOENSAYO

La presencia de anticuerpos anti-histonas o de anticuerpos anti-ADN nativo detectados mediante esta técnica, no se correlacionó con la presencia de anticuerpos anti-Sa por IB, pese a existir una tendencia a la asociación de ambas especificidades con los anticuerpos anti-Sa detectados por IB. De los 54 sueros positivos para anticuerpos anti-Sa por IB, 22 (40,7%) fueron positivos para anti-histonas, mientras que de los 40 sueros negativos para anticuerpos anti-Sa por IB, 11 (27,5%) fueron positivos para anti-histonas ( $\text{Chi}^2 = 1,235$ ;  $p = 0,2665$ ). De los 54 sueros positivos para anticuerpos anti-Sa por técnica de IB, 23 fueron positivos para anticuerpos anti-ADN nativo (42,6%), mientras que de los 40 sueros negativos para anticuerpos anti-Sa por técnica de IB, 11 fueron positivos para anti-ADN nativo (27,5%) ( $\text{Chi}^2 = 1,661$   $p = 0,1975$ ) (tabla XIX).

**TABLA XIX. ANTICUERPOS ANTI-SA DETECTADOS MEDIANTE "INMUNOBLOTTING" EN RELACION A ANTICUERPOS ANTI-HISTONAS Y ANTI-ADN NATIVO DETECTADOS MEDIANTE ENZIMOINMUNOENSAYO EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

ELISA	n = 54		n = 40		N =94	p*
	IB ANTI-SA(+)		IB ANTI-SA(-)			
	n	(%)	n	(%)		
ANTI-HISTONAS POSITIVO	22	(40,7%)	11	(27,5%)	33(35,1%)	NS
ANTI-HISTONAS NEGATIVO	32	(59,3%)	29	(72,5%)	61(64,9%)	NS
ANTI-ADN NATIVO POSITIVO	23	(42,6%)	11	(27,5%)	34(36,2%)	NS
ANTI-ADN NATIVO NEGATIVO	31	(57,4%)	29	(72,5%)	60(63,8%)	NS

\* Test de Chi cuadrado con corrección de Yates  
NS : No significativo

#### 2.4. DETERMINACION DE FACTOR REUMATOIDE MEDIANTE NEFELOMETRIA

Se observa una mayor frecuencia de FR entre los pacientes con anticuerpos anti-Sa en IB. De los 54 pacientes con anticuerpos anti-Sa, 53 (98,1%) tenían FR positivo. De los 40 pacientes sin anticuerpos anti-Sa, 30 (75%) tenían FR positivo ( $\text{Chi}^2=11,916$ ;  $\text{OR}=17,67$ ;  $\text{IC95\%}$  (3,46-90,21);  $\alpha = 0,0007$ ). (Tabla XX). Los pacientes con anticuerpos anti-Sa por IB, además, tienen tendencia a presentar niveles más elevados de FR (Media  $\pm$  SD :  $582,5 \pm 630,1$  unidades) frente a los pacientes con anticuerpos anti-Sa negativos por IB (Media  $\pm$  SD :  $399,5 \pm 525,7$  unidades), aunque sin alcanzar el nivel de significación requerido (diferencia media 183 unidades;  $p=0,18$ ).

**TABLA XX. ANTICUERPOS ANTI-SA DETECTADOS MEDIANTE "INMUNOBLOTTING" Y FACTOR REUMATOIDE DETECTADO POR NEFELOMETRIA EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

	<b>N = 54</b>	<b>N = 40</b>
<b>FACTOR REUMATOIDE</b>	<b>IB ANTI-SA(+)</b>	<b>IB ANTI-SA(-)</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>POSITIVO</b>	<b>53 (98,1%)</b>	<b>30 (75,0%)</b>
<b>NEGATIVO</b>	<b>1 (1,9%)</b>	<b>10 (25,0%)</b>

### **3. ESTUDIO DE LAS CORRELACIONES ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE DIFERENTES TECNICAS DE DETERMINACION DE AUTOANTICUERPOS Y EL PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA SOBRE PLACENTA HUMANA**

#### **3.1. TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA**

##### **3.1.1. TEJIDOS DE RATA**

No se observaron correlaciones entre los patrones de fluorescencia citoplasmáticos, obtenidos mediante IFI sobre estos sustratos y el patrón anular sincicial obtenido mediante IFI sobre placenta humana.

##### **3.1.2. CELULAS TUMORALES HEP-2**

No se detectó ninguna asociación significativa entre la presencia del patrón anular sincicial detectado mediante IFI sobre placenta humana y la aparición de determinado patrón de fluorescencia nuclear con IFI sobre células tumorales HEP-2. Así, se hallaron 41 pacientes con ANA positivos y patrón homogéneo sobre este sustrato, de los cuales 18 presentaban patrón anular sincicial en IFI sobre placenta humana y 23 eran negativos ( $\text{Chi}^2 = 1,027$ ;  $p = 0,31$ ;  $\alpha = 0,2984$ ). Se hallaron 7 pacientes con ANA positivos y patrón granular, de los cuales 3 presentaban patrón anular sincicial en IFI sobre placenta humana y 4 eran negativos ( $\text{Chi}^2 = 0,003$ ;  $p = 0,95$ ;  $\alpha = 0,711$ ). Finalmente, los 5 sueros con ANA positivos y



patrón mixto sobre células HEp-2, correspondían a 4 pacientes con patrón anular sincitial en IFI sobre placenta humana y 1 negativo ( $\text{Chi}^2 = 0,758$ ;  $p = 0,384$ ;  $\alpha = 0,3619$ ). (Tabla XXI).

**TABLA XXI. RELACION ENTRE PATRONES DE INMUNOFUORESCENCIA SOBRE CELULAS HEP-2 Y PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO POR IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

PATRON IFI	N = 48		N = 46		p*	α**
	IFI-PLACENTA PATRON ANULAR SINCICIAL		IFI-PLACENTA NEGATIVA			
	n	(%)	n	(%)		
Homogéneo	18	(37,5%)	23	(50,0%)	NS	NS
Granular	3	(6,3%)	4	(8,7%)	NS	NS
Mixto (H-G)	4	(8,3%)	1	(2,2%)	NS	NS

\* Test de Chi cuadrado con corrección de Yates

\*\* Test exacto de Fisher

NS : No significativo

La presencia de patrón anular sincitial detectado por IFI sobre placenta humana no se correlaciona con los títulos de ANA detectados por IFI sobre células HEp-2 ( $\text{Chi}^2 = 0,840$ ;  $p = 0,3594$ ;  $\alpha = 0,2756$ ). Tampoco se observa correlación cuando se consideran solamente los pacientes con ANA patrón homogéneo ( $\text{Chi}^2 = 1,026$ ;  $p = 0,311$ ;  $\alpha = 0,2186$ ) (tabla XXII).

**TABLA XXII. RELACION ENTRE TITULOS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR IFI SOBRE CELULAS HEP-2 Y PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO POR IFI SOBRE PLACENTA HUMANA EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

TITULO ANA	PACIENTES ANA (+)		PACIENTES ANA(+) PATRON HOMOGENEO	
	IFI (-)	IFI PAS	IFI (-)	IFI PAS
<1/160	18	12	15	8
≥1/160	10	13	8	10
$\alpha^*$	NS		NS	

\* Test exacto de Fisher

NS : No significativo

PAS : Patrón anular sincicial

### 3.1.3. NEUTROFILOS HUMANOS

De los 48 sueros con patrón anular sincicial por IFI sobre placenta humana, 9 (18,8%) mostraron patrón P-ANCA por IFI sobre neutrófilos humanos frente a 5 de los restantes 46 sueros (10,9%), siendo la asociación no significativa estadísticamente ( $\text{Chi}^2 = 0,613$ ;  $p=0,43$ ;  $\alpha = 0,3873$ ).

### 3.2. TECNICA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Los 4 sueros con anticuerpos anti-Ro detectados mediante CIE presentaban asimismo patrón anular sincitial en IFI sobre placenta humana. Sin embargo, no pudo demostrarse una correlación estadísticamente significativa ( $\text{Chi}^2 = 2,22$ ;  $p = 0,136$ ;  $\alpha = 0,1173$ ).

### 3.3. TECNICA DE ENZIMOINMUNOENSAYO

De los 48 sueros con patrón anular sincitial en IFI sobre placenta humana, 17 (35,4%) eran positivos para anticuerpos anti-histonas detectados por ELISA, mientras que de los 46 sueros con IFI negativa, 16 (34,8%) fueron positivos para anticuerpos anti-histonas ( $\text{Chi}^2 = 0$ ;  $p > 0,99$ ). Tampoco se encontró correlación estadísticamente significativa entre el patrón anular sincitial por IFI y la presencia de anticuerpos anti-ADN nativo. De los 48 sueros con patrón anular sincitial en IFI, 21 (43,8%) presentaron anticuerpos anti-ADN nativo por ELISA, mientras que de los 46 sueros negativos por técnica de IFI, 13 (28,3%) mostraron anticuerpos anti-ADN nativo por ELISA ( $\text{Chi}^2 = 1,816$   $p=0,1778$ ) (tabla XXIII).

**TABLA XXIII. PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO MEDIANTE IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA EN RELACION A ANTICUERPOS ANTI-HISTONAS Y ANTI-ADN NATIVO DETECTADOS MEDIANTE ENZIMOINMUNOENSAYO EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

ELISA	n = 48		n = 46		N = 94	P*
	IFI- PLACENTA PATRON ANULAR SINCICIAL		IFI- PLACENTA NEGATIVA		TOTAL	
	n	(%)	n	(%)		
ANTI-HISTONAS POSITIVO	17	(35,4%)	16	(34,8%)	33 (35,1%)	NS
ANTI-HISTONAS NEGATIVO	31	(64,6%)	30	(65,2%)	61 (64,9%)	NS
ANTI-ADN NATIVO POSITIVO	21	(43,8%)	13	(28,3%)	34 (36,2%)	NS
ANTI-ADN NATIVO NEGATIVO	27	(56,2%)	33	(71,7%)	60 (63,8%)	NS

\* Test de Chi cuadrado con corrección de Yates  
NS : No significativo

### 3.4. DETERMINACION DE FACTOR REUMATOIDE MEDIANTE NEFELOMETRIA

El patrón anular sincicial detectado en IFI sobre placenta humana se relaciona con la presencia de FR, puesto que, de los 48 pacientes con patrón anular sincicial en IFI, 47 (97,9%) presentaron FR positivo, mientras que de los 46 pacientes con IFI negativa, 36 (78,3%) presentaban FR positivo ( $\text{Chi}^2=8,783$ ;  $\text{OR}=13,06$ ;  $\text{IC}_{95\%}$  (2,39-71,41);  $\alpha = 0,0034$ ). (Tabla XXIV). Los enfermos con IFI positiva, además, tienen tendencia a presentar niveles más elevados de FR (Media  $\pm$  SD : 570,1  $\pm$

598,4 unidades) frente a los pacientes con IFI negativa (Media  $\pm$  SD : 445,0  $\pm$  597,7 unidades), aunque sin alcanzar el nivel de significación requerido (diferencia media 125,9 unidades;  $p=0,34$ ).

**TABLA XXIV. RELACION ENTRE PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO POR IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA Y FACTOR REUMATOIDE DETECTADO POR NEFELOMETRIA EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

FACTOR REUMATOIDE	N = 48	N = 46
	IFI- PLACENTA PATRON ANULAR SINCICIAL n (%)	IFI- PLACENTA NEGATIVA n (%)
POSITIVO	47 (97,9%)	36 (78,3%)
NEGATIVO	1 (2,1%)	10 (21,7%)

#### **4. COINCIDENCIAS Y DISCREPANCIAS DE LA TECNICA DE IFI Y LA TECNICA DE "INMUNOBLOTTING" PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-SA, EN RELACION A RESULTADOS DE LAS TECNICAS DE DETECCION DE AUTOANTICUERPOS**

El resumen de las asociaciones entre autoanticuerpos puede observarse en la tabla XXV. Tanto la técnica de IFI sobre placenta humana como la técnica de IB, considerada técnica de referencia para la detección de anticuerpos anti-Sa, no se asocian significativamente a patrones de fluorescencia citoplasmáticos sobre los diferentes sustratos estudiados, debido a la escasa incidencia de los mismos. Tampoco muestran asociación con algún patrón de ANA concreto (homogéneo, granular ó mixto). Los pacientes con anticuerpos anti-Sa por IB presentan un título más alto de ANA, a diferencia de los pacientes con patrón anular sincitial en IFI.

Ambas técnicas no se correlacionan con anticuerpos P-ANCA detectados por IFI sobre neutrófilos humanos, ni con anticuerpos anti-histonas o anti-ADN nativo detectados mediante ELISA.

Los pacientes con anticuerpos anti-Ro detectados por CIE presentan en todos los casos anticuerpos anti-Sa detectados por IB y patrón anular sincitial detectado por IFI, aunque no puede demostrarse una asociación estadísticamente significativa, debido al escaso número de pacientes con anticuerpos anti-Ro.

Tanto los anticuerpos anti-Sa detectados por IB, como el patrón anular sincitial en IFI sobre placenta humana, muestran una asociación altamente significativa con la positividad de factor reumatoide mediante nefelometría.

**TABLA XXV. CUADRO COMPARATIVO DE LAS ASOCIACIONES HALLADAS ENTRE ANTICUERPOS ANTI-SA DETECTADOS POR IB O POR IFI SOBRE PLACENTA HUMANA Y LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS EN 94 PACIENTES CON AR.**

AUTO- ANTICUERPOS	IB ANTI- Sa (+) N= 54	IB ANTI- SA (-) N=40	$\alpha^*$	IFI- ANTI- Sa (+) N=48	IFI- ANTI- Sa(-) N=46	$\alpha^*$
Patrón homogéneo	44,4%	42,5%	NS	37,5%	50,0%	NS
Patrón granular	5,6%	10,0%	NS	6,3%	8,7%	NS
Patrón mixto	5,6%	5,0%	NS	8,3%	2,2%	NS
ANA $\geq 1/160$	(n=30) 56,6%	(n=23) 26,1%	**	(n=25) 52,0%	(n=28) 35,7%	NS
ANA Homogéneo $\geq 1/160$	(n=24) 58,3%	(n=17) 23,5%	NS	(n=18) 55,5%	(n=23) 34,8%	NS
P-ANCA (+)	20,4%	7,5%	NS	18,8%	10,9%	NS
anti-Ro (+)	100%	0%	NS	100%	0%	NS
anti-histonas (+)	40,7%	27,5%	NS	35,4%	34,8%	NS
anti-ADNn (+)	42,6%	27,5%	NS	43,8%	28,3%	NS
Factor reumatoide	98,1%	75%	****	97,9%	78,3%	***

\* Nivel de significación estadística según test exacto de Fisher.

NS : No significativo

\*\* :  $\alpha < 0,05$       \*\*\* :  $\alpha < 0,01$       \*\*\*\* :  $\alpha < 0,001$

## 5. ESTUDIO DE LAS CORRELACIONES EXISTENTES ENTRE PRESENCIA DE PARAMETROS CLINICOS Y PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-SA DETECTADOS MEDIANTE "INMUNOBLOTTING" O IFI SOBRE PLACENTA HUMANA

### 5.1. "INMUNOBLOTTING"

No se observaron diferencias significativas en la incidencia de anticuerpos anti-Sa detectados por IB, en relación a la edad y el sexo de los pacientes. El tiempo de evolución de la enfermedad (Media  $\pm$  SD) en los pacientes con anticuerpos anti-Sa detectados por IB es de  $9,9 \pm 8,8$  años, frente a  $7 \pm 8$  años en los pacientes sin anticuerpos anti-Sa (diferencia media 2,97 años;  $p = 0,0966$ ). Por tanto, los pacientes con anticuerpos anti-Sa detectados por IB tienen una tendencia, no estadísticamente significativa, a presentar una enfermedad más evolucionada.

Entre los pacientes con anticuerpos anti-Sa, se observa una mayor frecuencia de estadios radiológicos considerados de afección articular grave, es decir, III y IV (53,7%), frente a los pacientes sin anticuerpos anti-Sa (25%)( $\text{Chi}^2 = 6,661$ ;  $p = 0,0099$ ;  $\text{OR}=3,48$ ;  $\text{IC}95\% (1,45-8,35)$ ;  $\alpha = 0,0062$ ).

En cuanto al grado funcional de los pacientes con anticuerpos anti-Sa detectados por IB, éstos presentan una tendencia a una afección más grave respecto al resto del grupo. Así, los estadios funcionales III y IV aparecen en el 31,5% de los pacientes, mientras que los pacientes sin



anticuerpos anti-Sa, presentan estos estadios funcionales avanzados en el 17,5% de casos. Sin embargo, no puede demostrarse una asociación estadísticamente significativa ( $\text{Chi}^2 = 1,684$ ;  $p=0,1943$ ;  $\alpha = 0,1545$ ) (Tabla XXVI).

**TABLA XXVI. ANTICUERPOS ANTI-SA DETECTADOS MEDIANTE "INMUNOBLOTTING" Y ESTADIOS RADIOLOGICOS Y FUNCIONALES EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

		N = 54		N = 40		$\alpha^*$
		IB ANTI-SA(+)		IB ANTI-SA(-)		
		n	(%)	n	(%)	
ESTADIO RADIOLOGICO	I-II	25	(46,3%)	30	(75,0%)	***
	III-IV	29	(53,7%)	10	(25,0%)	
ESTADIO FUNCIONAL	I-II	37	(68,5%)	33	(82,5%)	NS
	III-IV	17	(31,5%)	7	(17,5%)	

\* Nivel de significación estadística según Test exacto de Fisher  
 NS : No significativo                      \*\*\* :  $\alpha < 0,01$

La presencia de anticuerpos anti-Sa por IB se relaciona con una mayor probabilidad de afección extraarticular (83,3% de los pacientes con anticuerpos anti-Sa, frente al 57,5% del resto del grupo). ( $\text{Chi}^2 = 6,427$ ;  $\text{OR} = 3,70$ ;  $\text{IC}_{95\%}$  (1,46-9,32);  $p = 0,0112$   $\alpha = 0,0096$ ). Específicamente, la presencia de anticuerpos anti-Sa por IB se correlaciona de forma significativa con la presencia de SS, afección renal y anemia (Tabla XXVII).

**TABLA XXVII. ANTICUERPOS ANTI-SA DETECTADOS MEDIANTE "INMUNOBLOTTING" Y MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

MANIFESTACION CLINICA	N = 54		N = 40		$\alpha^*$
	IB ANTI-SA(+)		IB ANTI-SA(-)		
	n	(%)	n	(%)	
Afección cutánea	3	(5,6%)	0	(0,0%)	NS
Síndrome de Sjögren	19	(35,2%)	6	(15,0%)	**
Afección pulmonar	8	(14,8%)	1	(2,5%)	NS
Afección cardíaca	3	(5,6%)	0	(0,0%)	NS
Afección SNC	5	(9,3%)	2	(5,0%)	NS
Afección hepática	11	(20,4%)	3	(7,5%)	NS
Afección renal	9	(16,7%)	1	(2,5%)	**
Anemia	37	(68,5%)	13	(32,5%)	****
Linfopenia	8	(14,8%)	5	(12,5%)	NS

\* Nivel de significación estadística según Test exacto de Fisher  
 NS : No significativo      \*\* :  $\alpha < 0,05$       \*\*\*\* :  $\alpha < 0,001$

## 5.2. IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA

Al igual que en los pacientes con anticuerpos anti-Sa en IB, la presencia del patrón anular sincitial detectado mediante IFI sobre placenta humana, no presenta diferencias significativas en relación a la edad ni al sexo de los pacientes.

Los pacientes con patrón anular sincitial detectado por IFI, tienen un tiempo significativamente mayor de evolución de la enfermedad que

los pacientes con IFI negativa ( $11,3 \pm 8,5$  años frente a  $5,9 \pm 7,8$  años, diferencia media 5,5 años,  $p=0,0016$ ).

El patrón anular sincitial detectado mediante IFI se relaciona con formas más agresivas de la enfermedad, con estadios radiológicos más avanzados (III-IV) en un 62,5% de los pacientes con técnica de IFI positiva, frente a 19,6% en los pacientes con técnica de IFI negativa ( $\text{Chi}^2 = 16,112$ ;  $\text{OR}=6,85$   $\text{IC}_{95\%}$  (2,80-16,74);  $p < 0,0001$ ;  $\alpha < 0,0001$ ). Asimismo, la presencia de patrón anular sincitial mediante IFI sobre placenta humana se asocia con estadios funcionales más incapacitantes (III-IV) en el 37,5% de los pacientes, en comparación con el 13% de pacientes con afección grave y técnica de IFI sobre placenta humana negativa ( $\text{Chi}^2 = 6,159$ ;  $\text{OR}= 4$   $\text{IC}_{95\%}$  (1,47-10,87);  $p = 0,0131$ ;  $\alpha = 0,0089$ )(tabla XXVIII).

**TABLA XXVIII. RELACION ENTRE PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO POR IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA Y ESTADIOS RADIOLOGICOS Y FUNCIONALES EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

		N = 48	N = 46	a*
		IFI-PLACENTA PATRON ANULAR SINCICIAL n (%)	IFI-PLACENTA NEGATIVA n (%)	
ESTADIO RADIOLOGICO	I-II	18 (37,5%)	37 (80,4%)	*****
	III-IV	30 (62,5%)	9 (19,6%)	
ESTADIO FUNCIONAL	I-II	30 (62,5%)	40 (87,0%)	***
	III-IV	18 (37,5%)	6 (13,0%)	

\* Nivel de significación estadística según Test exacto de Fisher

NS : No significativo

\*\*\* :  $\alpha < 0,01$  \*\*\*\*\*:  $\alpha < 0,0001$

Asimismo, existe una mayor incidencia de manifestaciones extraarticulares entre los pacientes con patrón anular sincitial detectado mediante IFI. En concreto, se observa una incidencia significativamente más elevada de afección renal y anemia. La asociación con el SS es, del resto de manifestaciones extraarticulares, la que más se acerca al límite de significación estadística, con  $\alpha = 0,06$ . La asociación con otro tipo de manifestaciones extraarticulares no es estadísticamente significativa, probablemente debido al escaso número de pacientes con afección cutánea, pulmonar o cardíaca (tabla XXIX).

**TABLA XXIX. RELACION ENTRE PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO POR IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA Y MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES EN 94 PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

MANIFESTACION CLINICA	N = 48		N = 46		a*
	IFI-PLACENTA PATRON ANULAR SINCICIAL		IFI-PLACENTA NEGATIVA		
	n	(%)	n	(%)	
Afección cutánea	3	(6,25%)	0	(0,0%)	NS
Síndrome de Sjögren	17	(35,4%)	8	(17,4%)	NS
Afección pulmonar	7	(14,6%)	2	(4,3%)	NS
Afección cardíaca	3	(6,25%)	0	(0,0%)	NS
Afección SNC	4	(8,33%)	3	(6,5%)	NS
Afección hepática	10	(20,8%)	4	(8,7%)	NS
Afección renal	10	(20,8%)	0	(0,0%)	***
Anemia	35	(72,9%)	15	(32,6%)	****
Linfopenia	8	(16,7%)	5	(10,9%)	NS

\* Nivel de significación estadística según Test exacto de Fisher  
 NS : No significativo      \*\*\* :  $\alpha < 0,01$       \*\*\*\* :  $\alpha < 0,001$

## 6. COINCIDENCIAS Y DISCREPANCIAS DE LA TÉCNICA DE "INMUNOBLOTTING" PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-SA Y EL PATRÓN ANULAR SINCICIAL DETECTADO POR IFI, EN RELACION A CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

El resumen de las principales asociaciones de ambas técnicas con las características clínicas de los pacientes estudiados se expone en la tabla XXX.

Tanto la técnica de IB para la detección de anticuerpos anti-Sa como la presencia de patrón anular sincicial detectado por IFI sobre placenta humana, no presentan relación con la edad ni el sexo de los pacientes. En cambio, ambas se asocian a AR de más años de evolución, de forma estadísticamente significativa en el caso de la técnica de IFI.

Asimismo se relacionan con formas más graves de la enfermedad, tanto desde el punto de vista de criterios radiológicos como de criterios funcionales, siendo muy elevado el porcentaje de pacientes con estadios III y IV entre los pacientes con positividad por ambas técnicas. Sólo la asociación entre estadio funcional y anticuerpos anti-Sa detectados por técnica de IB no alcanza el grado requerido de significación estadística.

De igual forma, se observan asociaciones de ambas técnicas con la afección extraarticular o sistémica, considerada en su conjunto, ó con formas específicas de afección sistémica como la afección renal, la anemia y el SS.

**TABLA XXX. CUADRO COMPARATIVO DE LAS ASOCIACIONES HALLADAS ENTRE ANTI-SA DETECTADO POR IB O PATRON ANULAR SINCICIAL DETECTADO POR IFI SOBRE PLACENTA HUMANA Y LAS CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS 94 PACIENTES CON AR.**

CARACTERISTICA CLINICA	IB ANTI-Sa (+) N= 54	IB ANTI-SA (-) N=40	$\alpha^*$	IFI PAS N=48	IFI (-) N=46	$\alpha^*$
Tiempo de evolución de AR (media $\pm$ SD)	9,9 $\pm$ 8,8	7 $\pm$ 8	NS#	11,3 $\pm$ 8,5	5,9 $\pm$ 7,8	##
Estadio radiológico avanzado (III-IV)	53,7%	25,0%	***	62,5%	19,6%	*****
Estadio funcional avanzado (III-IV)	31,5%	17,5%	NS	37,5%	13,0%	***
Afección extraarticular	83,3%	57,5%	***	81,3%	63,0%	NS
Síndrome Sjögren	35,2%	15,0%	**	35,4%	17,4%	NS
Afección renal	16,7%	2,5%	**	20,8%	0%	***
Anemia	68,5%	32,5%	****	72,9%	32,6%	****

**PAS : Patrón anular sincicial**

**# : Nivel de significación estadística según test t de Student**

**NS : No significativo                      ## :  $p < 0,05$**

**\* : Nivel de significación estadística según test exacto de Fisher.**

**NS : No significativo                  \*\* :  $\alpha < 0,05$                   \*\*\*\* :  $\alpha < 0,001$**

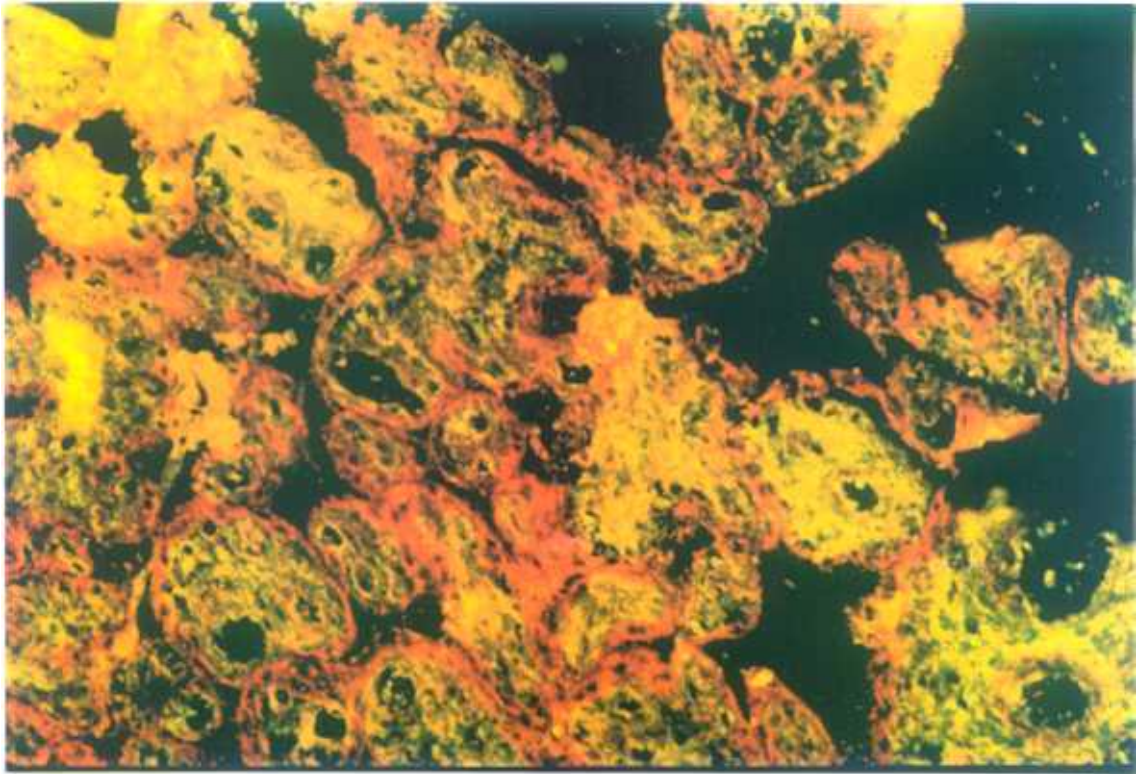
**\*\*\* :  $\alpha < 0,01$                   \*\*\*\*\* :  $\alpha < 0,0001$**

**7. EVALUACION DE LA TECNICA DE IFI SOBRE PLACENTA HUMANA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-SA : TITULACION DE LOS ANTICUERPOS Y ENSAYO DE ADSORCION CON ANTIGENO SA PURIFICADO.**

Con la finalidad de determinar, mediante técnica de IFI, el título de los anticuerpos que originan el patrón de fluorescencia anular sincitial en los pacientes con AR, se realizaron diluciones seriadas de los mismos a partir de la dilución de trabajo (1:5), examinándolos nuevamente por IFI sobre placenta humana a las diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80. La mayor parte de los sueros (85,4%), perdieron la capacidad de dar una tinción positiva de fluorescencia a la dilución 1:20 (figura 7). La titulación máxima obtenida por los diferentes sueros se especifica en la tabla XXXI.

**TABLA XXXI. TITULACION DE ANTICUERPOS CON PATRON ANULAR SINCICIAL POR IFI SOBRE SUSTRATO DE PLACENTA HUMANA EN PACIENTES CON AR**

TITULO DE ANTICUERPOS	SUEROS
	N (%)
1/5	30 (62,5%)
1/10	11 (22,9%)
1/20	5 (10,4%)
1/40	2 (4,2%)
1/80	0 (0,0%)



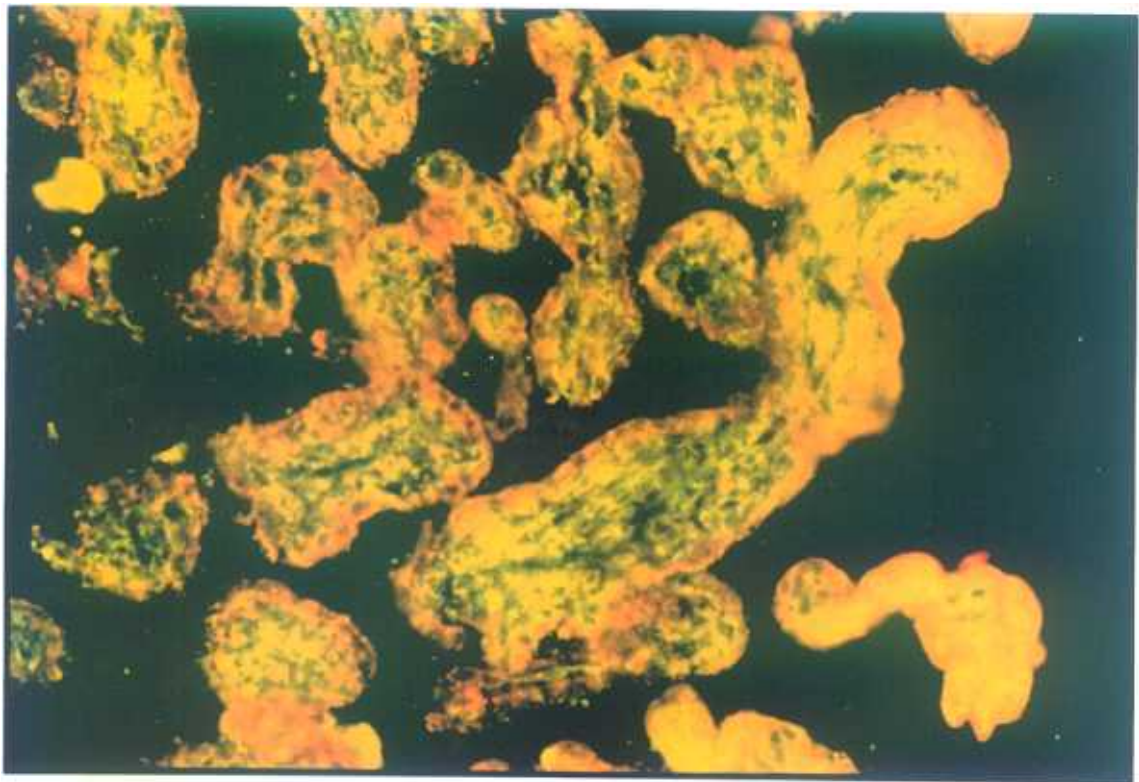
**Figura 7. IFI sobre sustrato de placenta humana a termino.**

(Microscopio de fluorescencia, 10X)

Suero de un paciente utilizado a la dilución 1/80. Obsérvese la pérdida total de la tinción fluorescente constituyente del patrón anular sincitial.



Los sueros que conservaron su positividad a la dilución 1/20, fueron empleados en el ensayo de adsorción con antígeno Sa purificado, para determinar si el patrón de inmunofluorescencia observado sobre placenta humana (patrón anular sincitial) correspondía a los anticuerpos anti-Sa. Posteriormente, al realizar la técnica de IFI sobre dicho sustrato utilizando los sueros adsorbidos, se produjo la desaparición de la tinción fluorescente cuando se utilizaba el antígeno Sa a la concentración de 10 mg/mL (figura 8).



**Figura 8. IFI sobre sustrato de placenta humana a termino.**

(Microscopio de fluorescencia, 20X)

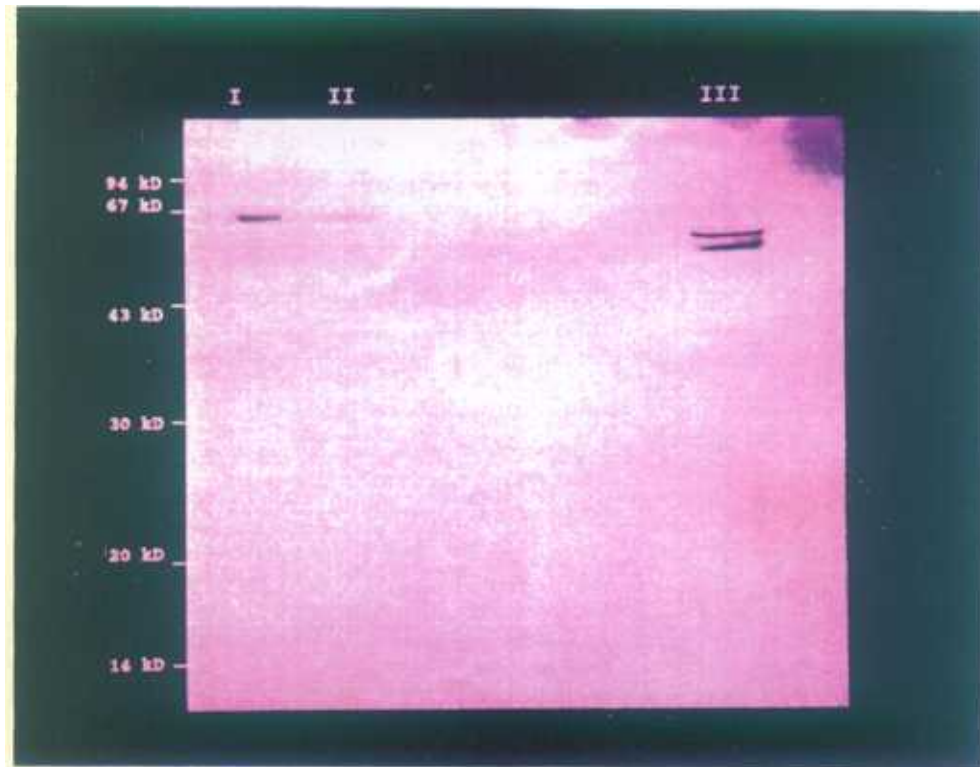
Suero de un paciente adsorbido con antígeno Sa purificado. Obsérvese la pérdida total del patrón de fluorescencia anular sincitial.

## **8. LOCALIZACION CELULAR Y SUBCELULAR DEL ANTIGENO SA**

### **8.1. LOCALIZACION A NIVEL CELULAR**

#### **8.1.1. "INMUNOBLOTTING" CON EXTRACTO DE MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA**

Con la finalidad de determinar la fracción celular frente a la cual se producía la reactividad del antígeno Sa, se realizó la técnica de IB utilizando separadamente, como extractos, las distintas fracciones obtenidas por el método de centrifugación diferencial de Graham, y como anticuerpo, sueros de pacientes con AR que habían mostrado reactividad anti-Sa por IB con extracto completo de placenta humana. Se obtuvo el patrón de bandas de precipitación correspondiente a los anticuerpos anti-Sa en aquellos casos en que se emplearon como extracto las fracciones P2 y P3 (figura 9). Estas fracciones, obtenidas como sedimentos después de la segunda y tercera centrifugación del homogeneizado de placenta, contienen primordialmente mitocondrias de gran tamaño (fracción P2) y mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso (fracción P3).



**Figura 9. IB con extracto de fracciones mitocondriales de placenta humana a termino, obtenidas por centrifugación diferencial.**

I : Fracción P2

II : Fracción P3

III : Control (extracto salino de placenta humana)

### **8.1.2. "INMUNOBLOTTING" CON EXTRACTO DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA**

A diferencia de lo ocurrido con el inmunoblotting con extracto de placenta humana, no fue posible detectar la reactividad del antígeno Sa con ninguno de los sueros de los pacientes mediante IB con extracto de mitocondrias de hígado de rata.

### **8.1.3. ADSORCION DE SUEROS CON ANTICUERPOS ANTI-SA CON EXTRACTO DE MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA Y POSTERIOR ANALISIS MEDIANTE IFI**

Los sueros con anticuerpos anti-Sa que habían presentado reactividad en la tecnica de IFI sobre sustrato de placenta humana a la dilución 1/20, fueron sometidos al procedimiento de adsorción con extracto de mitocondrias de placenta humana, y subsiguientemente fueron nuevamente examinados mediante IFI sobre el mismo sustrato. Se observó que, tras la adsorción, se producía una pérdida de la tinción fluorescente anular sincitial en todas las muestras (figura 10b).

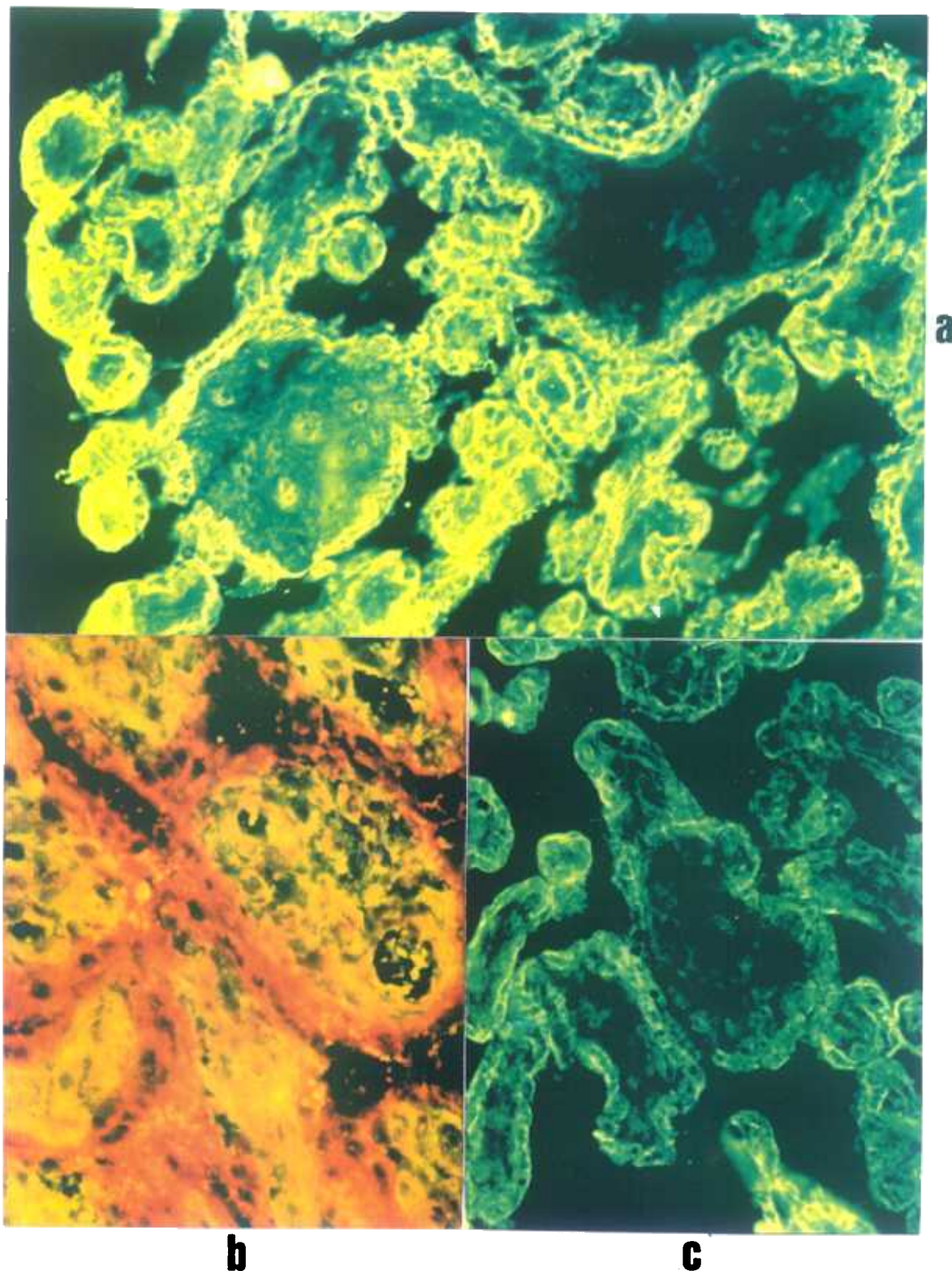
## 8.2. LOCALIZACION A NIVEL SUBCELULAR

### 8.2.1. ADSORCION DE SUEROS CON ANTICUERPOS ANTI-SA CON LAS DIFERENTES SUBFRACCIONES MITOCONDRIALES DE PLACENTA HUMANA Y POSTERIOR ANALISIS MEDIANTE IFI

Con la finalidad de determinar la localización del antígeno Sa en alguna de las diferentes subfracciones mitocondriales, purificadas por el método de Soper y Pedersen, se realizaron procedimientos de adsorción con cada una de las subfracciones mitocondriales, examinando posteriormente los sueros con anticuerpos anti-Sa adsorbidos mediante IFI sobre sustrato de placenta humana.

Ninguna de las subfracciones mitocondriales fue capaz de eliminar totalmente la reactividad anti-Sa de ninguno de los sueros por ninguna de las dos técnicas de detección utilizadas, aunque se producía una mayor atenuación de la fluorescencia cuando se utilizaba la subfracción correspondiente a la membrana interna mitocondrial (figura 10c).





**Figura 10. IFI sobre placenta humana. Ensayos de adsorción**

a : Patrón anular sincitial en el suero sin adsorber

b : Negativización tras adsorción con fracción mitocondrial de placenta humana

c: Atenuación parcial del patrón anular sincitial tras adsorción con subfracción de membrana interna mitocondrial.

## DISCUSION

La AR es la enfermedad reumática inflamatoria autoinmune más frecuente, afecta a más de un 1% de la población (29,68). Actualmente no existe un marcador serológico específico de la AR, si bien se considera que, en pacientes con clínica compatible con AR, la detección de niveles elevados de FR apoya el diagnóstico (29, 57). Los anticuerpos anti-Sa pueden detectarse precozmente en la AR, y su detección puede ser útil en el diagnóstico de dicha enfermedad, como ha sido recientemente descrito en un estudio (203). Utilizando la técnica de IB, estos autores obtienen una sensibilidad de 32,8% y una especificidad de 99,7%, con un valor predictivo (VP) positivo de 98,4% y un VP negativo de 75,5%, cuando la incidencia de AR entre la población de enfermos estudiados es de un 32,4%. En dicha serie, la detección de FR mediante nefelometría tiene una sensibilidad de 76,3% y una especificidad de 84,2%, con un VP positivo de 73,7% y un VP negativo de 86%. En otro estudio de nuestro grupo, se estimó que el cálculo teórico para una incidencia de AR de un 1% en la serie de pacientes da VP positivo y negativo de 52,4% y 99,3% para los anticuerpos anti-Sa, y de 0,9% y 98,5% para el FR, respectivamente (207).

Estos datos sugieren que el valor de la detección de los anticuerpos anti-Sa por IB es superior a la del FR en el despistaje serológico de la AR. Sin embargo, el uso de la técnica de IB como técnica "standard" plantea una serie de problemas, como su baja sensibilidad y el ser una técnica demasiado laboriosa. Por tanto, para que la detección de los anticuerpos anti-Sa para el diagnóstico de la AR pueda realizarse en la

práctica diaria, debería realizarse mediante una técnica rápida y sencilla, y que además tenga una buena sensibilidad y especificidad. Como en el caso de otros autoanticuerpos, los principales métodos candidatos para el despistaje serológico de los ac. anti-Sa serían la IFI y la técnica de ELISA.

Recientemente, en nuestro grupo, se han realizado estudios que han permitido purificar el antígeno Sa, demostrándose la existencia de dos tipos de anticuerpos anti-Sa en los sueros de pacientes con AR; uno dirigido contra el antígeno Sa degradado, y otro dirigido contra el antígeno Sa nativo (207). Los anticuerpos anti-Sa nativo detectados mediante ELISA no son específicos de AR, ya que pueden detectarse en el suero de pacientes diagnosticados de LES. En la AR, los anticuerpos anti-Sa detectados por ELISA aparecen en el 33,3% de los pacientes, siendo la especificidad de 93,5%, con un VP positivo de 64,7% y un VP negativo de 80%. El cálculo teórico para una incidencia de pacientes con AR de un 1% en la serie, da un VP positivo de 4,9% y un VP negativo de 99,2% (207). Por tanto, el anticuerpo anti-Sa nativo detectado por la técnica de ELISA sería un parámetro inferior al FR detectado por nefelometría, dada la menor sensibilidad del ELISA.

Sin embargo, con el método de ELISA utilizando el antígeno Sa purificado y degradado, se obtienen unos resultados similares al IB. La sensibilidad se incrementa, se detectan anticuerpos anti-Sa en el 76% de los pacientes con AR, pero la especificidad disminuye, puesto que se detectan en el 22% de pacientes con LES (207). En definitiva, el ELISA puede ser muy útil en la detección de los anticuerpos anti-Sa, pero hemos descrito anteriormente que la respuesta de anticuerpos anti-Sa es



heterogénea, y que la capacidad de detección de anticuerpos depende de la degradación del antígeno. Dicha variabilidad (207), puede limitar técnicamente la utilidad del ELISA como prueba diagnóstica. Además, la escasa disponibilidad de antígeno Sa puro es otra limitación de la utilización del ELISA en la práctica de laboratorio diaria.

La IFI es la técnica más idónea para el despistaje de los anticuerpos antinucleares y anticitoplasmáticos en las enfermedades autoinmunes. Para determinar la utilidad diagnóstica de la técnica de IFI para la detección de los anticuerpos anti-Sa en pacientes con AR, se han estudiado 94 sueros y se han comparado con los resultados obtenidos mediante la técnica de IB, considerada de referencia en la detección de anticuerpos anti-Sa.

Inicialmente, se utilizó la técnica de IFI empleando como sustrato células tumorales HEp-2 y preparaciones de estómago, riñón e hígado de rata, que son los comúnmente utilizados para la detección de anticuerpos antinucleares y anticitoplasmáticos. Los resultados mostraron sólo una tinción de fluorescencia nuclear con diferentes patrones (homogéneo, granular y mixto) y citoplásmica (anti-mitocondrial, anti-músculo liso y anti-células parietales gástricas), no hallándose patrones citoplasmáticos ni nucleares diferentes de los ya mencionados. En consecuencia, estos sustratos, ampliamente utilizados para el despistaje de autoanticuerpos, no son útiles para la identificación de anticuerpos anti-Sa.

A continuación, se utilizó la técnica de IFI con los sustratos relacionados con anticuerpos organoespecíficos, como son tejido adrenal, tiroides y pancreas de mono, dado que los tejidos humanos equivalentes son de muy difícil obtención. El resultado de la IFI sobre estos sustratos

fue negativo, encontrándose únicamente los patrones de tinción nuclear ya descritos previamente.

Dado que hasta el momento se habían examinado sustratos animales y células humanas de origen tumoral, se analizó la especie-especificidad de los anticuerpos anti-Sa utilizando los sueros de pacientes con AR sobre otros sustratos, incluyendo células y tejidos humanos normales. La técnica de IFI utilizando neutrófilos humanos demostró la presencia de algunos casos positivos con la clásica tinción perinuclear (P-ANCA), sin observarse otros patrones de fluorescencia sobre este sustrato.

Sobre la base de los resultados obtenidos por la técnica de IB con fracciones celulares de placenta humana, que sugerían la reactividad de los anticuerpos anti-Sa con mitocondrias, se utilizó hígado humano (tejido rico en mitocondrias y sustrato idóneo para la detección de anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos, como los anti-LKM-3) como sustrato de la técnica de IFI. Los resultados demostraron que, por esta metodología, algunos sueros de pacientes con AR presentaron patrones de fluorescencia correspondientes a anticuerpos antinucleares, sin poder identificarse un patrón de fluorescencia compatible con otra reactividad.

Dado que el grupo de Mènard y colaboradores, así como nuestro propio grupo de trabajo, habíamos obtenido resultados positivos en la detección de anticuerpos anti-Sa mediante la técnica de IB con extractos salinos de placenta humana, el siguiente sustrato utilizado en la técnica de IFI fue placenta humana. Es en este sustrato donde, por primera vez, se detecta un patrón de fluorescencia diferente a los observados frente a anticuerpos de distintas especificidades, ya sea antinucleares ó

anticitoplasmáticas. El patrón de fluorescencia que aparece frente a los anticuerpos anti-Sa tiñe homogéneamente el citoplasma de las células del sincitiotrofoblasto placentario, adquiriendo la fluorescencia en su conjunto un aspecto que hemos dado en denominar "patrón anular sincitial". Este patrón de fluorescencia es de fácil identificación y se encuentra en un porcentaje significativo (51,1%) de los pacientes estudiados. La reproductibilidad de la técnica es alta. Este patrón de fluorescencia anular sincitial se distingue con facilidad de otros patrones antitrofoblásticos descritos por otros autores, como el patrón que originan los anticuerpos anti-TA1, cuya tinción, limitada al sincitiotrofoblasto, aparece sólo en las áreas apicales del sincitio, o el patrón que originan los anticuerpos anti-plasminógeno, cuya tinción es citoplasmática, tiñendo tanto el sincitio como el citotrofoblasto (224).

Finalmente, se utilizó como sustrato de la técnica de IFI células JAR, que proceden de un coriocarcinoma humano. Los resultados mostraron exclusivamente patrones nucleares de fluorescencia. Ello podría estar relacionado con una escasa formación de estructuras sincitiales "in vitro" por parte de esta estirpe celular, pese a su origen trofoblástico.

La correlación entre la detección del patrón de anticuerpos anti-Sa por la técnica de IFI y los anticuerpos anti-Sa detectados por técnica de IB es significativa, aunque existen discordancias. De los 54 sueros con anticuerpos anti-Sa detectados por IB, 39 muestran un patrón anular sincitial por IFI. Esta discordancia podría deberse a una mayor sensibilidad de la técnica de IB ó a la ausencia de anticuerpos anti-Sa nativo en algunos sueros, lo que haría que no fuesen detectados por la

técnica de IFI, y sí por IB, que detecta anti-Sa degradado. De los 40 sueros anti-Sa negativos por la técnica de IB, la técnica de IFI detectó 9 sueros con patrón anular sincitial, tratándose probablemente de sueros con anticuerpos dirigidos exclusivamente contra epítomos nativos del antígeno Sa. No obstante, existe una asociación altamente significativa entre la presencia de anticuerpos anti-Sa por la técnica de IFI y de anticuerpos anti-Sa por la técnica de IB ( $p$  inferior a 0,0001).

Para analizar si el patrón de fluorescencia que aparece en placenta humana tras incubación con los sueros de pacientes con AR y anticuerpos anti-Sa se debe a una reactividad específica frente al antígeno Sa, se realizaron tests de adsorción con antígeno Sa purificado. La adsorción de los sueros de los pacientes con antígeno Sa purificado eliminó la tinción fluorescente. Estos resultados confirman que el patrón anular sincitial hallado mediante IFI sobre placenta humana corresponde a una reactividad específica de los anticuerpos anti-Sa con el antígeno Sa. La adsorción con mitocondrias humanas también eliminó la tinción fluorescente, y ello está en relación con la presencia del antígeno Sa en la fracción mitocondrial, como fue demostrado por la técnica de IB. Utilizando subfracciones mitocondriales para la adsorción, la inhibición de la tinción de fluorescencia fue sólo parcial, destacando entre ellas la subfracción correspondiente a la membrana interna mitocondrial. La diferente capacidad inhibitoria puede ser debida a una mayor cantidad de antígeno Sa en dicha subfracción mitocondrial.

Una vez confirmada la utilidad de la técnica de IFI sobre placenta humana para la identificación de los anticuerpos anti-Sa, analizamos el enfoque semicuantitativo de la técnica. En un número reducido de sueros,

que habían dado una reactividad intensa por IFI a la dilución de trabajo (1:5), no se pudo detectar la reactividad (patrón de fluorescencia positivo) a diluciones iguales o superiores a 1/80. Estos resultados sugieren que el rango de la dilución que permite detectar la reactividad frente al antígeno Sa mediante IFI es pequeño (dilución 1/5 a 1/40), lo que hace dificultoso el poder diferenciar claramente un grupo de pacientes con títulos elevados de anticuerpos anti-Sa.

La detección de anticuerpos anti-Sa, tanto por técnica de IFI sobre placenta humana, como por técnica de IB, no se asocia significativamente con ninguno de los autoanticuerpos analizados en este estudio (anticuerpos antinucleares : anti-ENA, anti-ADN, anti-histonas; anticuerpos anticitoplásmáticos : anti-mitocondria, anti-músculo liso, ANCA). Sin embargo, se encontró una asociación, altamente significativa, entre los anticuerpos anti-Sa detectados por ambas técnicas y la presencia de FR sérico.

En estudios previos realizados en nuestro centro utilizando la técnica de IB, se ha podido demostrar una asociación entre la presencia de anticuerpos anti-Sa y una mayor incidencia de manifestaciones extraarticulares, en particular con la presencia de nódulos reumatoides, afección pulmonar, SS y amiloidosis renal (200,202,206,225). También se ha observado que la enfermedad articular parece ser más grave en los pacientes con anticuerpos anti-Sa detectados por técnica de IB. En nuestro estudio, los resultados obtenidos utilizando la técnica de IB son similares a los descritos anteriormente.

Por otra parte, las asociaciones entre las alteraciones clínicas de los pacientes con AR y la presencia de los anticuerpos anti-Sa, identificados mediante IFI, es similar a la obtenida mediante IB. Los anticuerpos anti-Sa detectados mediante la técnica de IFI se asocian con una mayor frecuencia de afección renal y anemia. La asociación con SS está próxima al grado de significación estadística. Los anticuerpos anti-Sa detectados por la técnica de IFI también se asocian con un mayor tiempo de evolución de la enfermedad y estadios radiológicos y funcionales más avanzados.

Hemos demostrado que, utilizando la técnica de IFI con sustrato de placenta humana, se pueden detectar los anticuerpos anti-Sa con un patrón de fluorescencia característico y reproducible. La técnica de detección es semicuantitativa.

Actualmente, los anticuerpos anti-Sa se pueden detectar mediante tres técnicas diferentes : IB, ELISA e IFI.

El IB permitió inicialmente detectar anticuerpos frente al antígeno Sa degradado, reconociendo una proteína de 48 KD y sus productos de degradación, utilizando como extractos placenta o bazo humanos. Estos anticuerpos frente al antígeno Sa degradado son específicos de AR, ya que no se detectan en pacientes con otras enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, teniendo por tanto valor diagnóstico. Los anticuerpos anti-Sa detectados por IB pueden aparecer precozmente, sufriendo fluctuaciones a lo largo de la evolución de la enfermedad. (206). Su aparición coincide con las exacerbaciones clínicas y se asocia con una mayor incidencia de manifestaciones extraarticulares, en particular, con la presencia de

nódulos reumatoideos, enfermedad pulmonar, SS y amiloidosis. En conclusión, tienen valor diagnóstico y pronóstico (206). Sin embargo, el IB es una técnica muy laboriosa y no permite el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras, requiriendo personal experimentado tanto en la realización de la técnica como en la identificación del patrón de bandas característico.

El ELISA, desarrollado recientemente por nuestro grupo de trabajo (207), permite la detección de anticuerpos dirigidos contra el antígeno Sa nativo. Estos anticuerpos anti-Sa nativo se han detectado tanto en pacientes con AR como en pacientes con LES. Por consiguiente, el ELISA es una técnica de gran sensibilidad pero de menor especificidad respecto al IB. En enfermos con AR, las manifestaciones clínicas de los pacientes con anticuerpos anti-Sa detectados por ELISA son similares a las de los pacientes con anticuerpos anti-Sa detectados mediante IB. Los pacientes con LES y anticuerpos anti-Sa detectados mediante ELISA presentan un mayor grado de afección articular respecto al resto de pacientes con LES (207). La técnica de ELISA es un método rápido y sencillo que permite la cuantificación de los anticuerpos anti-Sa, siendo útil para la monitorización y seguimiento de los pacientes.

La técnica de IFI sobre sustrato de placenta humana a término, desarrollada en este trabajo, permite la detección de anticuerpos anti-Sa dirigidos contra el antígeno Sa nativo. Esta técnica ha permitido comprobar la localización citoplasmática, y específicamente mitocondrial, del antígeno Sa, identificando un patrón de fluorescencia característico de los anticuerpos anti-Sa en el citoplasma de las células que forman el sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriónicas. Al igual que el IB, los

anticuerpos anti-Sa detectados por IFI se asocian con una enfermedad más grave y con mayor incidencia de manifestaciones extraarticulares. Con respecto a las técnicas de ELISA e IB, la IFI tiene la gran ventaja de ser una técnica altamente sensible y fácil de realizar en la práctica diaria del laboratorio. Permite además un análisis semicuantitativo en la detección de los anticuerpos anti-Sa. Al igual que la técnica de IB, requiere para su interpretación personal debidamente entrenado.

En la actualidad, los datos disponibles sugieren que el ELISA podría ser la técnica de uso para el despistaje de los anticuerpos anti-Sa. Dicha técnica permitiría detectar y cuantificar los anticuerpos anti-Sa en poblaciones amplias de pacientes. Sin embargo, para su empleo en la práctica clínica, deben estandarizarse los métodos de purificación de antígeno Sa, realizando la técnica de ELISA, tanto con antígeno Sa degradado como con antígeno Sa nativo, de forma independiente. En el caso de la existencia de anticuerpos dirigidos contra el antígeno Sa degradado, la técnica idónea de confirmación será el IB, y en el caso de la existencia de anticuerpos dirigidos frente al antígeno Sa nativo, la IFI.

La detección de anticuerpos frente al antígeno Sa degradado mediante las técnicas de ELISA e IB puede tener utilidad para el diagnóstico serológico de AR en la población general. Además, permite seleccionar un grupo de pacientes con enfermedad grave que requiere un tratamiento mucho más agresivo. Es posible también que la cuantificación de estos anticuerpos sea útil para monitorizar la respuesta terapéutica.

La detección de anticuerpos frente al antígeno Sa nativo mediante las técnicas de ELISA e IFI pueden permitir definir un subgrupo de

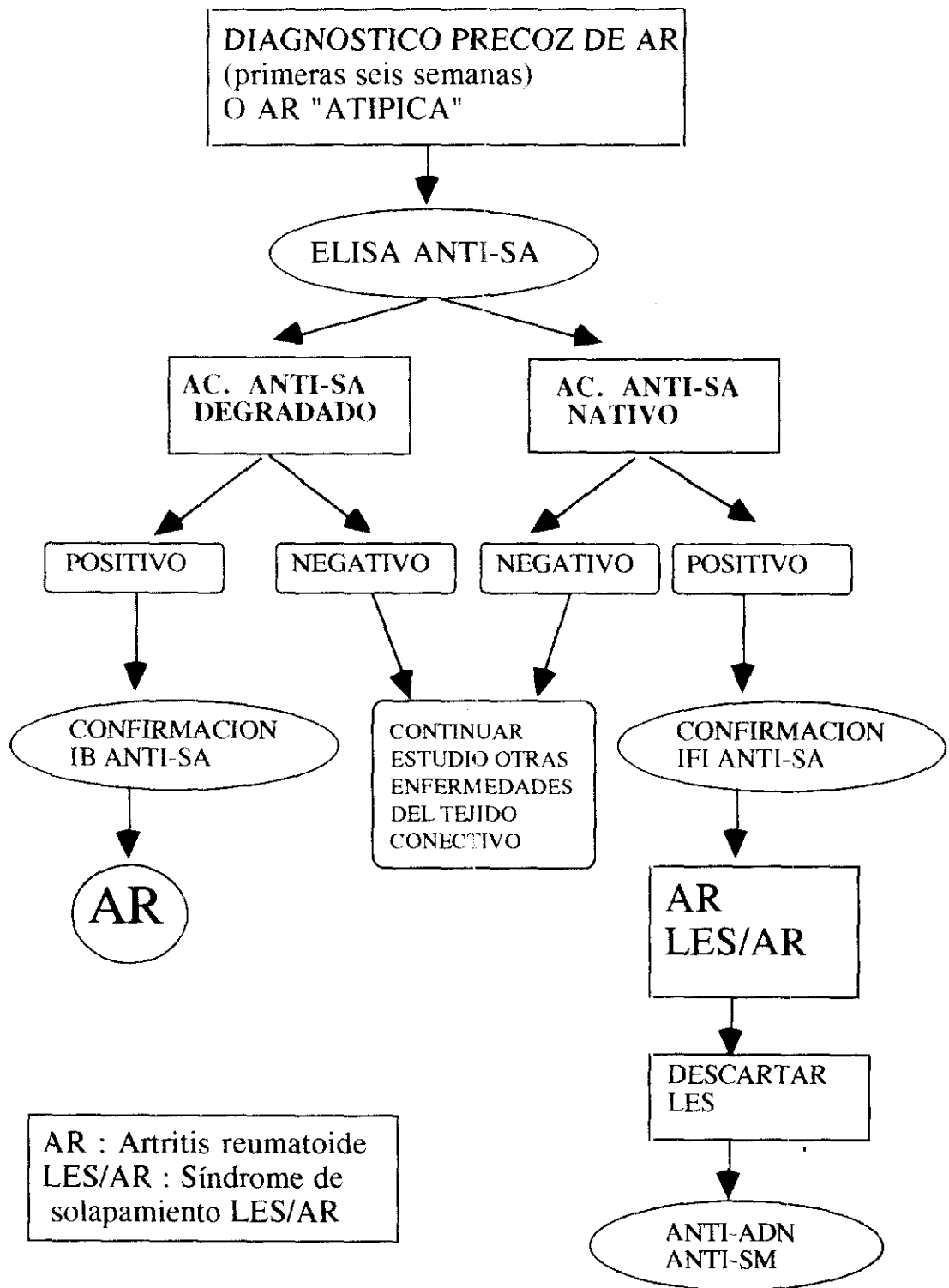


pacientes con LES y artritis grave, si bien es menos útil en el diagnóstico de AR por su menor especificidad. Creemos interesante analizar en el futuro la incidencia de anticuerpos anti-Sa nativo, detectados mediante ELISA e IFI, en otras conectivopatías. Los resultados preliminares (207), utilizando ELISA, sugieren que únicamente aparecen en AR y LES. por lo que, de confirmarse mediante ELISA e IFI, los anticuerpos anti-Sa nativo constituirían un marcador del síndrome de solapamiento AR-LES.

Un posible algoritmo útil en el diagnóstico precoz de AR podría ser el que se muestra en la figura 11, aunque se necesita realizar nuevos estudios para su confirmación.

La secuenciación, identificación y clonaje del antígeno Sa, permitirá averiguar si es realmente un antígeno mitocondrial, como indican nuestros resultados preliminares, y proveerán de los instrumentos necesarios para estudiar sus características y funciones biológicas. Estos conocimientos pueden ayudar a desarrollar nuevos métodos de detección de los anticuerpos anti-Sa.

**Figura 11. Algoritmo sugerido para el diagnóstico precoz de artritis reumatoide**



## CONCLUSIONES

1.- La técnica de IFI sobre cortes congelados de placenta humana a término permite la detección de anticuerpos anti-Sa.

2.- El patrón de IFI anti-Sa es citoplasmático, siendo diferente de los patrones citoplasmáticos conocidos en las enfermedades autoinmunes, en particular del patrón anti-mitocondria (M2).

3.- El patrón de fluorescencia característico de los anticuerpos anti-Sa se detecta en el citoplasma de las células que forman el sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriónicas, formando un patrón citoplasmático nuevo, que hemos denominado "anular sincitial".

4.- Los anticuerpos anti-Sa reaccionan en IB con una fracción citoplasmática de placenta humana, rica en mitocondrias. La adsorción con extracto total de mitocondrias de placenta humana elimina la tinción de fluorescencia, lo que sugiere que el antígeno Sa es de localización mitocondrial.

5.- La concordancia entre IFI e IB es del 75%. Las discordancias observadas pueden deberse a que la IFI detecta únicamente anticuerpos dirigidos frente al antígeno Sa nativo, y el IB anticuerpos dirigidos frente el antígeno Sa degradado.

6.- Los resultados obtenidos mediante IFI en pacientes con AR son similares a los obtenidos mediante IB en cuanto a las manifestaciones clínicas asociadas. Los pacientes con IFI positiva presentan un aumento

significativo de FR, anemia y manifestaciones renales, así como una mayor severidad en las lesiones radiológicas y en la limitación funcional.

7.- La técnica de IFI para la detección de anticuerpos anti-Sa complementa a la técnica de IB en el diagnóstico de AR.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity. Nashville, Vanderbilt University Press, 1959.
2. Kisielow P, Blüthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 1988; 333: 742-746.
3. Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in normal humans. I. Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.* 1982; 28: 2779-2787.
4. Cohen IR, Wekerle H. Autoimmunity, self-recognition, and blocking factors. In : Talal N, ed. *Autoimmunity : genetic, immunologic, virologic and clinical aspects.* New York, Academic Press, 1977: 231-243.
5. Cohen IR, Cooke A. Natural autoantibodies might prevent autoimmune disease. *Immunol. Today* 1986; 7: 363-364.
6. Rose NR, Lucas PL, Dilley M, Reed AH. En "Clinics in Andrology. V. Regulation of male fertility". Cuningham GR, Schill WB, Hafez ESE, eds). pp 197-204. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Netherlands, 1980.
7. Chapel H, Haeney M. Infection, en "Essentials of clinical immunology" 2 ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1988. pp 43-67.
8. Rose NR, Beisel KW, Herslowitz A, Neu N, Wolfgram LJ, Alvarez FL, et al. Cardiac myosin and autoimmune myocarditis, en "Autoimmunity and autoimmune disease - CIBA foundation symposium 129". Everet D, Whelan J, eds. John Wiley & sons, Chichester, UK, 1987, pp 3-24.

9. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J. Immunol.* 1987; 139: 3630-3636.
10. Worledge SM, Carstairs KC, Dacie JV. Autoimmune haemolytic anaemia associated with alfa-metildopa therapy. *Lancet* 1966; ii: 135-139.
11. Wasserman NH, Penn AS, Freimuth PI, Treptow N, Wentzel S, Cleveland L, et al. Anti-idiotypic route to anti-acetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 4810.
12. Lennon VA. Anti-Purkinje cell cytoplasmic and neuronal nuclear antibodies aid diagnosis of paraneoplastic autoimmune neurological disorders. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1989; 52: 1438-9.
13. Anhalt GJ, Kim S, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, et al. Paraneoplastic pemphigus : an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N. Eng. J. Med.* 1990; 323: 1729-35.
14. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983; ii: 1115-9.
15. Ofosuappiah W, Mokhtarian F. Characterization of a T-suppressor cell line that downgrades experimental allergic encephalomyelitis in mice. *Cell Immunol.* 1991; 135: 143-153.
16. Karpus WJ, Swanborg RH. CD4+ suppressor cells inhibit the function of effector cells of experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *J. Immunol.* 1991; 146: 1163-8.
17. Talor E, Rose NR. En "Cellular basis of immune modulation". Kaplan JG, Green Dr, Bleackley RC, eds. Alan R. Liss, New York, USA, 1989, pp 391-4.

18. Goodwin JS. Suppressor cells in human disease. Marcel Dekker, New York, USA, 1981.
19. Volpe R. Immunoregulation in autoimmune thyroid disease. N. Eng. J. Med. 1987; 316: 44-46.
20. Kuppers RC, Suiter T, Gleichmann E, Rose NR. The induction of organ-specific antibodies during the graft-vs-host reaction. Eur. J. Immunol. 1988; 18: 161-6.
21. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. Adv. Immunol. 1985; 37: 269.
22. Lindstrom J. Immunobiology of myasthenia gravis, experimental autoimmune myasthenia gravis and Lambert-Eaton syndrome. Annu. Rev. Immunol. 1979; 27: 1-51.
23. Adams DD. Long-acting thyroid stimulator : how receptor autoimmunity was discovered. J. Autoimmunity 1988; 1: 3-9.
24. Weigle WO. Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalomyelitis. Adv. Immunol. 1980; 30: 159-273.
25. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates : requirement for both L3T4+ and LyT-2+ cells. J. Exp. Med. 1987; 166: 823-32.
26. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. : Autoinmunidad y enfermedad autoinmune, en Roitt IM, Brostoff J, Male DK (eds) Inmunology. (edición española), 1988, cap 23, pag 23.2.
27. Mackay IR, Rose NR. Autoimmunity : Horizons, en Rose NR, Mackay IR (eds) : The autoimmune diseases II. Academic Press Inc, San Diego, 1992, cap 17.

28. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.* 1951; 38: 1-10.
29. Paulino J, Pinedo A, Wong C, Crespo C: Estudio general de la frecuencia de enfermedades reumáticas en una población determinada con fines epidemiológicos. *Rev. Esp. Reumatol.* 1982; 9: 1-8.
30. Hochberg MC. Adult and juvenile rheumatoid arthritis : current epidemiological concepts. *Epidemiol. Rev.* 1981; 3: 27-41.
31. Zvaifler NJ. Pathogenesis of the joint disease of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med* 1983; 75: 3-12.
32. Garcia-Vicuna R, Humbria A, Postigo AA et al. VLA family in rheumatoid arthritis : evidence for in vivo regulated adhesion of synovial fluid T-cells to fibronectin through VLA-5 integrin. *Clin. Exp. Immunol.* 1992; 88: 435-441.
33. Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH. The importance of the T-cell in initiating and mantaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 729-735.
34. Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in rheumatoid synovitis?. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 768-773.
35. Lotz M, Kekow J, Carson D. Transforming growth factor- $\alpha$  and cellular immune responses in synovial fluids. *J. Immunol.* 1990; 144: 4189-4194.
36. Coll J, Rives A, Griñó MC, Sitoain J, Vivancos J, Balcells A. Prevalence of Sjögren´s syndrome in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 1987; 46: 286-289.
37. Martinez-Castro E, Olivé A, Bonet M, Carbonell J, Cobo E, Juncá S. Artritis reumatoide y síndrome de Sjögren. Referencia especial al tiempo de evolución de la artritis reumatoide. *Med. Clin.* 1990; 94: 655-659.



38. Andonopoulos AP, Drogos AA, Skopouli FN, Aoritidis NC, Moutsopoulos HM. Secondary Sjögren's syndrome on rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1987; 14 : 1098-1103.
39. Shearn MA. Sjögren's syndrome. In "Smith LM (ed). Major problems in internal medicine". Vol 11. p129-169, WB Saunders Co, Philadelphia, 1971.
40. Branson-Geokas B, Epstein M, Chismorio F, Frion G. Sjögren's syndrome, clinical and laboratory studies. *Arthritis Rheum.* 1971; 14: 152-158.
41. Jouquau J, LeGoff P, Fauquert P, Pennec Y, Youinou P. Etude comparative des polyarthrites rhumatoïdes avec et sans syndrome de Gougerot-Sjögren. *Rev. Rhum.* 1986; 53: 691-695.
42. Delcambre B, Maliar P, Leonardelli J, Sulman Ch, Defrance D. Dépistage systématique du syndrome de Gougerot-Sjögren au cours de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Rhum.* 1977; 44: 675-683.
43. Bardin TH, Dryll A, Bebeyre N, Peltier AP, Ryckewaert A: Les polyarthrites rhumatoïdes avec anticorps antinucléaires. Etude prospective sur 50 cas personnels. *Nouv. Presse Med.* 1982; 11: 501-504.
44. Janin-Mercier A, Sauvezie B, Ristori JM, Betaïl G, Veyre AK, Rawpon S. Histological and immunological study in patients with rheumatoid arthritis showing isolated abnormalities of salivary scintigraphy. *J. Clin. Immunol.* 1982; 2: 282-288.
45. Boire G, Ménard HA. Clinical significance of anti-Ro (SSA) antibodies in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 1988; 15: 391-394.
46. Feruley GR, Lackner R. Amyloidosis in rheumatoid arthritis and significance of unexplained albuminuria. A report of eight cases. *Br. Med. J.* 1955; 1: 1129-1132.
47. Unger PN, Zuckerbrod M, Beck GJ, Steel JM. Amyloidosis in rheumatoid arthritis. A report of 10 cases. *Am Med Sci* 1948; 216: 51-56.

48. Missen GAK, Taylor JD. Amyloidosis in rheumatoid arthritis. *J. Pathol. Bacteriol.* 1956; 71: 179.
49. Naranjo A, Navarro F, Vargas MC. Utilidad de la biopsia de grasa subcutánea abdominal cuando se emplea como método de detección de amiloidosis. *Med. Clin.* 1989; 93: 156.
50. Wegelius O, Wajin F, Falck HM, et al. Follow-up study of amyloidosis secondary to rheumatic disease. In "Glenner GG, Costa PP, De Freitas AF (eds). *Amyloid and amyloidosis*". p 189-190. *Excerpta Medica, Amsterdam*, 1980.
51. Burry HC. Renal disorders in rheumatoid arthritis. *Rheum. Phys. Med.* 1971; 11: 2-9.
52. Roselló MR. Diagnóstico precoz de la amiloidosis secundaria en los reumatismos inflamatorios crónicos. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 1986.
53. Artandi SE, Calame KL, Morrison SL, Bonagura VR. Monoclonal IgM rheumatoid factors bind IgG at a discontinuous epitope comprised of amino acid loops from heavy-chain constant-region domain-2 and domain-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 94-98.
54. Nemazee D, Sato V. Induction of rheumatoid antibodies in the mouse. Regulated production of autoantibodies in the secondary humoral response. *J. Exp. Med.* 1983; 158: 529.
55. Cats A, Hazevoet HM: Significance of positive tests for rheumatoid factor in the prognosis of rheumatoid arthritis: a follow-up study. *Ann. Rheum. Dis* 1970; 29: 254-259.
56. Quismorio FP, Beardmore T, Kaufman RL, Mongan ES. IgG-Rheumatoid Factor and antinuclear antibodies in rheumatoid vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1983; 52: 333-340.

57. Carson DA. Rheumatoid factor. En : Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (eds). Textbook of Rheumatology pp 198-207. WB Saunders Co, Philadelphia, 1989.
58. Theofilopoulos AN, Buronboy G, Rospalutto JJ, Ziff M. IgM-RF and LMW IgM. An association with vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1974; 17: 272-275.
59. Mongan ES, Cass RM, Jacose RF, Vaughan JH. A study of the relation of seronegative and seropositive rheumatoid arthritis to each other and to necrotizing vasculitis. *Am. J. Med.* 1969; 47: 23-25.
60. Scott DGI, Bacon PA, Tribe CR. Systemic rheumatoid vasculitis : a clinical and laboratory study of 50 cases. *Medicine* 1981; 60 : 288-297.
61. Alarcón GS, Koopman WJ, Schrohenloher RE. Differential patterns of in vitro IgM rheumatoid factor synthesis in seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1982; 25: 150-5.
62. Feigenbaum SL, Masi AT, Kaplan SB. Prognosis in rheumatoid arthritis - a longitudinal study of newly diagnosed younger patients. *Am. J. Med.* 1979; 66: 377-384.
63. Van der Heijde DM, Van Riel PL, Van Rijeveijk MH, Van de Putte LB. Influence of prognostic features on the final outcome in rheumatoid arthritis : a review of the literature. *Semin. Arthritis Rheum.* 1988; 17: 284-292.
64. Gordon DA, Stein JL, Broder I. The extraarticular features of rheumatoid arthritis - a systematic analysis of 127 cases. *Am. J. Med.* 1973; 54: 445-452.
65. Geirsson AJ, Sturfelt G, Truedsson L. Clinical and serological features of severe vasculitis in rheumatoid arthritis : prognostic implications. *Ann. Rheum. Dis.* 1987; 46: 727-733.

66. Schneider HA, Yanker RA, Katz P, Longley S, Panush RS. Rheumatoid vasculitis : experience with 13 patients and review of the literature. *Semin. Arthritis Rheum.* 1985; 14: 280-286.

67. Van Zeben D, Hazes JMW, Zwinderman AH, Cats A, Van der Voort EAM, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis : results of a follow-up study. *Ann. Rheum. Dis.* 1992; 51: 1029-1035.

68. Harris ED. Rheumatoid arthritis : the clinical spectrum. En : Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (eds). *Textbook of Rheumatology.* WB Saunders Co, Philadelphia, 1981.

69. Salvarini C, Macchioni P, Mantovani W, et al: Extrarticular manifestations of rheumatoid arthritis and HLA antigens in Northern Italy. *J. Rheumatol.* 1992; 19: 242-246.

70. Cathcart ES. Amyloidosis. In "Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (eds). *Textbook of Rheumatology*".p 1531-1532, WB Saunders Co, Philadelphia, 1989.

71. López-Longo FJ, Ménard HA, Boire G, Sánchez Atrio AI, y col.: El sistema Sa, un nuevo ENA reconocido por sueros de pacientes con artritis reumatoide. *Rev. Esp. Reumatol.* 1990; 17 (supl.1): 5 (abstract).

72. Aitchison CT, Peebles C, Joslin F, Tan EM: Characteristics of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. Reactivity of rheumatoid factor with a histone dependent nuclear antigen. *Arthritis Rheum.* 1980; 23: 528-538.

73. Bardin T: Valeur de la biologie lupique au cours des polyarthrites rhumatoïdes. *Ann. Med. Interne* 1984; 135: 411-413.

74. Ward DJ, Johnson GD, Holborow EJ: Antinuclear factor in rheumatoid arthritis: Its incidence and clinical significance. *Ann. Rheum. Dis.* 1964; 23: 306-310.

75. Steven MM, Teh LG, Teg LS, y col.: Value of test for antinuclear antibodies in rheumatic diseases. *Br. Med. J.* 1984; 288: 1724-1725.
76. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.* 1982; 33: 167-240.
77. Agnello V, Arbetter A, Ibáñez de Kasep G, Powell R, Tan EM, Joslin F: Evidence for a subset of rheumatoid factor that cross-react with DNA-histones and have a direct cross-idiotype. *J. Exp. Med.* 1980; 151: 1514-1527.
78. Maini RN, Charles PJ, Venables PJW: Antinuclear antibodies in the immunotaxonomy of connective tissue disease. *Scand. J. Rheumatol.* 1985; suppl.56: 49-57.
79. Aarden LA, Lakmaker F, De Groot ER, Swaak AJG, Feltkamp TEW: Detection of antibodies to DNA by radio-immunoassay and immunofluorescence. *Scand. J. Rheumatol.* 1975; 11: 12-19.
80. Bell C, Talal N, Schur PM: Antibodies to DNA in patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1975; 18: 535-540.
81. Grennan DM, Sloane D, Behan A, Dick WC: Clinical significance of antibodies to native DNA as measured by a DNA binding technique in patients with articular features of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1977; 36: 30-33.
82. Holian J, Griffiths D, Glass DN, Maini RN, Scott JT: Human anti-DNA antibody : reference standards for diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 1975; 34: 438-443.
83. Rochmis PG, Palefsky H, Becker M, Roth H, Zvaifler NJ: Native DNA binding in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1974; 33: 357-360.

84. Roques CF, Smilovici W, Oksman F, Amignes H, Fournie A, Ruffie R: Anticorps antinucléaires et polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Méd. Toulouse* 1977; 13: 179-184.
85. Sany J: Intérêt diagnostique et pronostique des anticorps antinucléaires. In "Clot J, Sany J" Deuxième cours d'Immuno-Rhumatologie. pp 171-183, Montpellier, 1980.
86. Monier JC, Perraud M, chevalier Ph y col.: Specificity of antibodies against dsDNA in autoimmune disorders. *Lancet* 1978; 1: 989-990.
87. Winfielf JB, Shaw M, Taylor RP, Eisenberg A: Nature of double stranded DNA binding activity in seropositive rheumatoid arthritis: formation of low avidity DNA/rheumatoid factor/IgG low density lipoprotein complexes. *J. Immunol.* 1981; 126: 1596-1602.
88. Kahn MF, Peltier AP, Haim T, Marcheteau M, Seze S: Anticorps anti-ADN. Bilan d'une méthode nouvelle de détection utilisant l'immunofluorescence indirecte. *Rev. Rhum.* 1973; 40: 393-398.
89. Koffler D, Carr R, Agnello V, Thoburn R, Kunke LHG: Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease. *J. Exp. Med.* 1971; 134: 294-296.
90. Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 1966; 96: 464-471.
91. Mattioli M, Reichlin M. Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. *J. Immunol.* 1971; 107: 1281-1290.
92. Northway JD, Tan EM. Differentiation of antinuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1972; 1: 140-154.
93. Mattioli M, Reichlin M. Physical association of two nuclear antigens and mutual occurrence of their antibodies : the relationship of the Sm and

103. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counter-immunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum.* 1976; 19: 574-580.
104. Notman D, Kurata N, Tan EM. Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann. Intern. Med.* 1975; 83: 464-469.
105. Smeenk R, Westgeest T, Swaak T: Antinuclear antibodies determination: The present state of diagnostic and clinical relevance. *Scand. J. Rheumatol.* 1985; 56: 78-92.
106. López-Longo FJ, Rodríguez-Mahou M, Rivera J, y col. Heterogeneidad de los anticuerpos (Ac) anti-ENA: Ac dirigidos contra proteínas desnaturalizadas presentes en extractos de timo. *Rev. Esp. Reumatol.* 1990; 17(supl.1): 6.
107. Venables PJW, Erhardt GC, Maini RN. Antibodies to ENA in Rheumatoid Arthritis: Relationship to vasculitis and circulating immune complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 39: 146-153.
108. Warlow RS. Antibodies to extractable nuclear antigens (ENA) in rheumatoid arthritis assayed by ELISA. *Scand. J. Rheumatol.* 1986; 15: 185-192.
109. Wolin SL, Steitz JA. The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins : identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 1996-2000.
110. Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. A 52 kd protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 1560-1571.
111. Elkon KB, Culhane L. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with sicca syndrome and lupus erythematosus. *J. Immunol.* 1984; 132: 2350-2356.

RNA protein (Mo) systems in SLE sera. *J. Immunol.* 1973; 110: 1318-1324.

94. Lerner MR, Steitz JA. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 5495-5497.

95. Yang VW, Lerner MR, Steitz JA, Flint SJ. A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 1371-1375.

96. Padgett RA, Mount SM, Steitz JA, Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 1983; 35: 101-107.

97. Bozzoni I, Amaldi F, Anneis F, et al. Splicing of *Xenopus laevis* ribosomal protein RNAs is inhibited in vivo by antisera to snRNP. *J. Mol. Biol.* 1984; 180: 1173-1178.

98. Tan EM. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 1989; 44: 93-151.

99. Pettersson IM, Hinterberger M, Mimori T, Gottlieb E, Steitz JA. The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins : identification of multiple components reactive with anti-(U1) RNP and anti-Sm antibodies. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 5907-5914.

100. Verheijen R, Kuippers H, Vooijs P, Van Venrooij W, Ramaekers F. Distribution of the 70K U1 RNA-associated protein during interphase and mitosis. *J. Cell. Sci.* 1986; 86: 173-190.

101. López-Longo FJ, Carreño L. Sistemas antigénicos ENA en la artritis reumatoide. *Rev. Esp. Reumatol.* 1991; 18: 63-69.

102. Shimerling RH, Delbanco TL. The rheumatoid factor: An analysis of clinical utility. *Am. J. Med.* 1991; 91: 528-534.



112. Rader MD, O'Brien C, Liu Y, Harley JB, Reichlin M. Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 1293-1298.
113. Boire G, Craft J. Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 270-279.
114. Boire G, Gendron M, Monast N, Bastin B, Menard HA : Purification of antigenically intact Ro ribonucleoproteins; biochemical and immunological evidence that the 52-KD protein is not a Ro protein. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 100: 489-498.
115. Lopez-Longo FJ, Rodriguez-Mahou M, Escalona M, et al : Heterogeneity of the anti-Ro (SS-A) response in rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 1994; 21: 1450-1456.
116. McCauliffe DP, Lux FA, Lieu TS, et al. Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 1379-1391.
117. Reichlin M, Rader M, Harley JB. Autoimmune response to the Ro/SSA particle is directed to the human antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 1989; 76: 373-377.
118. Alexander EL, Hirsch TJ, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB. Ro (SSA) and La (SSB) antibodies in the clinical spectrum of Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.* 1982; 9: 239-246.
119. Whaley K, Alspaugh MA. Sjögren's syndrome. In "Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (eds.) *Textbook of Rheumatology*" p 999-1019, WB Saunders, Philadelphia, 1989.
120. Maddison PJ, Mogavero H, Provost TT y col. The clinical significance of autoantibodies to a soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue disease. *J. Rheumatol.* 1979; 6: 189-195.

121. Reichlin M, Wasicek CA. Clinical and biologic significance of antibodies to Ro/SSA. *Human Pathol.* 1983; 14: 401-405.
122. Hughes GR. Autoantibodies in lupus and its variants. Experience in 1000 patients. *Br. Med. J.* 1984; 285: 339-342.
123. Balsa A, Pascual E, Vesga JC, y col. Significado del anticuerpo SSA/Ro en la artritis reumatoide. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología, Vigo, 4-7 de Junio, 1986; 92 (abstract).
124. Consuegra GG, Mateo I, Garrido G, Linares LF, Carrera PF. Características clínicas, toxicidad y respuesta al tratamiento de los pacientes con artritis reumatoide y anti-Ro. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología, Vigo 4-7 de Junio, 1986; 129 (abstract).
125. Alspaugh M, Buchanan WW, Whaley K. Precipitating antibodies to cellular antigens in Sjögren's Syndrome, Rheumatoid Arthritis and other organ and non-organ specific autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 1978; 37: 244-246.
126. Monteagudo I, López-Longo FJ, Pereda C y col. Síndrome de Sjögren. Estudio prospectivo en 26 pacientes. *Rev. Esp. Reumatol.* 1986; 13: 90-94.
127. Pérez T, López-Longo FJ, Rodríguez-Mahou M, y col. Heterogeneidad de la respuesta anti-Ro/SSA en las enfermedades reumáticas. *Rev. Esp. Reumatol.* 1992; 19: 197-198.
128. Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan DJ, Fox RI, Tan EM. SS-A/Ro Antigen are 52 and 60 kD proteins and their autoantibodies reveal differences between primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1987; 31(4): 64 (abstract B27).
129. Ménard HA, Boire G, López-Longo FJ, Masson C, Lapointe N. S.RUPUS: A Rheumatoid Arthritis subset predicted and defined by the presence of antinative Ro antibody. *Arthritis Rheum.* 1989; 32(4): (abstract A 25).

130. Rinke J, Steitz JA. Precursor molecules of both human 5S ribosomal and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La antibodies. *Cell* 1982; 29: 149-159.
131. Chan EKL, Francoeur AM, Tan EM. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein. *J. Immunol.* 1986; 136: 3744-3749.
132. Chan EKL, Tan EM. The small nuclear ribonucleoprotein SS-B/La binds RNA with a conserved protease-resistant domain of 28KD. *Mol. Cell Biol.* 1987; 7: 2588-2591.
133. Gottlieb E, Steitz JA. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBOJ* 1989; 8: 841-850.
134. García de la Torre I, Miranda Méndez L. Studies of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1982; 9: 603-606.
135. Kassan SS, Akizuki M, Steinberg AD, Reddick RL, Chused TM. Antibodies to a soluble acidic nuclear antigen in Sjögren's syndrome. *Am. J. Med.* 1977; 63: 328-355.
136. De Rooij DJ, Van de Putte LV, Habets WJ, y col. The use of immunoblotting to detect antibodies to nuclear and cytoplasmic antigens. *Scand. J. Rheumatol.* 1988; 17: 353-364.
137. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachogiannopoulos P, Brennan DM, Hough D. Antibodies to nRNP, Sm, Ro (SSA) and La (SSB) detected by ELISA: Their specificity and interrelations in connective tissue disease sera. *Clin. Exp. Immunol.* 1985; 62: 337-345.
138. Weill BJ, Job-Deslandre C, Menkes CJ, Amor B. Étude des anticorps spécifiques des antigènes nucléaires solubles au cours des vascularites auto-innunes. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* 1987; 54: 453-456.

139. Velthuis PJ, Kater L, Van der Tweel I, y col. In vivo ANA of the skin: diagnostic significance and association with selective ANA. *Ann. Rheum. Dis.* 1990; 49: 163-167.
140. Scott DGI, Skinner RP, Bacon PA, Maddison PJ. Precipitating antibodies to nuclear antigens in systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1984; 56: 601-606.
141. Erhardt CC, Munford PA, Venables PJW, Maini RN. Factors predicting a poor life prognosis in Rheumatoid Arthritis: And eight year prospective study. *Ann. Rheum. Dis.* 1989; 48: 7-13.
142. Goldman RD, Milsted A, Schloss JA, Starger JM Yerna MJ: Cytoplasmic fibers in mammalian cells: cytoskeletal and contractile elements. *Ann. Rev. Physiol.* 1979; 41:703-722.
143. Osung OA, Chandra M, Holborow EJ: Antibodies to intermediate filaments of the cytokeleton in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1982; 41: 69-73.
144. Kataaha PK, Mortazavi-Milani SM, Russell G, Holborow EJ: Anti-intermediate filament antibodies, antikeratine antibody, and antiperinuclear factor in rheumatoid arthritis and infectious mononucleosis. *Ann. Rheum. Dis.* 1985; 44: 446-449.
145. Kurki P, Virtanen I: The detection of human antibodies against cytoskeletal components. *J. Immunol. Methods.* 1984; 67: 209-223.
146. Youinou P, Le Goff, Colaco CB, y col.: Antikeratin antibodies in serum and synovial fluid show specificity for rheumatoid arthritis in a study of connective tissue diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 1985; 44: 450-454.
147. Hajiroussou VJ, Skingle J, Gillett AP, Webley M: Significance of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1985; 12: 57-59.

148. Kurki P, Aho K, Palosmo T, Heliövaara M: Immunopathology of Rheumatoid Arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 914-917.
149. Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDJ, Clark CJM, Hamblin TJ: Anti-Keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.* 1979; 2: 97-99.
150. Ordeig J, Guardia J: Diagnostic value of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1984; 11: 602-604.
151. Kirstein H, Mathiesen FJ: Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis: methods and clinical significance. *Scand. J. Rheumatol.* 1987; 16: 331-337.
152. Paimela L, Gripenberg M, Kurki P, Leirisalo-Repo M: Antikeratin antibodies: diagnostic and prognostic markers for early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1992; 51: 743-746.
153. Vincent C, Serre G, Lapeyre F, et al : High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called "antikeratin antibodies". *Ann. Rheum. Dis.* 1989; 48: 712-722.
154. Serre G, Vincent C, Viraben R, Soleilhavoup JP: Natural IgG and IgM autoantibodies to epidermal keratins in normal human sera I. ELISA titration, immunofluorescence study. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 88: 21-27.
155. Muñoz S, Alvarez R, Cuesta M, y col.: The clinical significance of the antiperinuclear factor. *Arthritis Rheum.* 1992; 35 (suppl)(9): (abstract 10 103).
156. Scott DL, Delamare JP, Jones LJ, y col.: Significance of laminar antikeratin antibodies to rat oesophagus in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1981; 40: 267-271.
157. Faber V, Elling P, Norup G, Mansa B, Nissen NI: An antinuclear factor specific for leucocytes. *Lancet* 1964; 2: 344-345.

158. Sany J: Polyarthrite rhumatoïde et anticorps antinucléaires. *Sem. Hôp. (Paris)* 1985; 61: 661-665.
159. Wiik A: Granulocyte specific antinuclear antibodies. *Allergy* 1980; 35: 263-289.
160. Kallenberg CGM, Mulder AHL, Horst G, De Weerd H, Limberg PC: Granulocyte-specific ANA in rheumatoid arthritis are directed against azurophilic granule proteins from neutrophils. *Arthritis Rheum.* 1991; 34 (suppl): S 135.
161. Niemhuis RLF, Mandema E: A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis, the antiperinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* 1964; 23: 302-305.
162. Hoet RMA, Boerbooms AMTh, Ruiters DJ, Van Venrooij VJ: Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for Rheumatoid Arthritis: localisation of perinuclear factor and profilaggrin. *Ann. Rheum. Dis.* 1991; 50: 611-618.
163. Westgeest AAA, Van Loon Am, Van der Ligt JTM, Van de Putte LBA, Boerbooms AMTh: Antiperinuclear factor, a rheumatoid arthritis specific auto-antibody: its relation to Epstein-Barr virus. *J. Rheumatol.* 1989; 16: 626-630.
164. Westgeest AAA, Boerbooms AMTh, Van de Putte LBA: The influence of serum dilution on findings of antiperinuclear factor prevalence in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 759-760.
165. Youinou P, Le Goff P, Dumay A, Lelong A, Fauquert P, Jouquan J: The antiperinuclear factor I. Clinical and serologic associations. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1990; 8: 259-264.
166. Youinou P, Berthelot JM, Péron A, Leroux AM, Le Goff P: Anticorps antipérinucléaires et antigènes correspondants. *Rev. Rhum.* 1992; 59 (6 bis): 43-51S.

167. Janssens X, Veys EM, Verbruggen G, Declercq L: The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1988; 15: 1346-1350.
168. Westgeest AAA, Boerbooms AMTh, Jongmans M, Vandenbroucke JP, Vierwinden G, Van de Putte LBA: Antiperinuclear factor: indicator of more severe disease in seronegative rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1987; 14: 893-897.
169. Miossec P, Yoninou P, Le Goff P, y col.: Clinical relevance of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 1982; 1: 185-189.
170. Alspaugh MA, Tan EM: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 1975; 55: 1067-1073.
171. Alspaugh MA, Talal N, Tan EM: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1976; 19: 216-222.
172. Catalano MA, Carson DA, Slovin SF, Richman DD, Vaughan JH: Antibodies to Epstein-Barr virus determined antigen in normal subjects and in patients with seropositive rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 5825-5828.
173. Ng KC, Brown KA, Perry JD, Holborow EJ: Anti-RANA antibodies. A marker for seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Lancet* 1980; 1: 447-449.
174. Cohen S, Stastny P, Sontheimer RD: concurrence of subacute cutaneous lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1986; 29: 421-425.
175. Billings PB, Hoch SO, White PJ, Carson DA, Vaughan JH: Antibodies to the Epstein-Barr virus-nuclear antigen and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 7104-7108.

176. Venables PJW, Roffe LM, Erhardt CC, Maini RN, Edwards JMB, Porter AD: Titers of antibodies to RANA in rheumatoid arthritis and normal sera: Relationship to Epstein-Barr virus infection. *Arthritis Rheum.* 1981; 24: 1459-1464.
177. Sculley TB, Pope JH, Hazelton RA: Identification of multiple Epstein-Barr virus induced nuclear antigens with sera from patients with rheumatoid arthritis. *J. Virol.* 1984; 52: 88-93.
178. Sculley TB, Pope JH, Hazelton RA: Comparison between the presence of antibodies to Epstein-Barr virus induced nuclear antigen-2 and the rheumatoid arthritis nuclear antigen in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 1986; 29: 964-970.
179. Louri T, Petersen J, Rhodes G y col.: Antibodies to synthetic peptides from Epstein-Barr nuclear antigen-1 in sera of patients with early rheumatoid arthritis and in preillness sera. *J. Rheumatol.* 1990; 17: 1442-1449.
180. Silverman SL, Schumacher HR: Antibodies to Epstein-Barr nuclear antigens in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1981; 24: 1465-1472.
181. Hassfeld W, Seiner G, Hartmuth K y col.: Demonstration of a new anticleur antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989; 32: 1515-1520.
182. Steiner G, Hassfeld W, Skriner K, Sinski O, Smolen J: Purification of RA-33 and related antigens. XIIth European Congress of Rheumatology 30th June - 6th July. Budapest, Hungarian Rheumatology 1991; 32: 276.
183. Hassfeld W, Steiner G, Smolen J: Anti-RA 33. A valuable serologic marker for early diagnosis of rheumatoid arthritis. XIIth European Congress of Rheumatology 30th June - 6th July. Budapest, Hungarian Rheumatology 1991; 32: 206.



184. Steiner G, Hartmuth K, Skriner K, y col.: Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA-33 shows that it is indistinguishable from the A<sub>2</sub> protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 1061-1066.
185. Meyer O, Tauxe F, Fábregas L, Haïm T, Kahn MF: Les anticorps anti-RA 33 au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Relation avec les autres auto-anticorps. *Rev. Rhum.* 1992; 59: 364.
186. Clague RB: Autoantibodies to cartilage collagens in rheumatoid arthritis: do they perpetuate the disease or are they irrelevant? *Br. J. Rheumatol.* 1989; 28: 1-6.
187. Andriopoulos NA, Mestecky J, Miller EJ, Bradley EL: Antibodies to native and denatured collagens in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1976; 19: 613-617.
188. Möttönen T, Hannonen P, Oka M, y col.: Antibodies against native type II collagen do not precede the clinical onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 776-779.
189. Buchanan RRC, Wardlaw JR, Riglar AG, Littlejohn GO, Miller MH: Antiphospholipid antibodies in the Connective Tissue Diseases: Their relation of antiphospholipid syndrome and forme frustre disease. *J. Rheumatol.* 1989; 16: 757-761.
190. Fort JG, Cowchock FS, Abruzzo JL, Smith JB: Anticardiolipin antibodies in patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1987; 30: 752-760.
191. Deighton CM, Gray J, Bint AJ, Walker DJ: Specificity of the proteins antibody response in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1992; 51: 1206-1207.
192. Ebringer H, Cox NL, Abuljadayel I, y col.: Klebsiella antibodies in ankylosing spondylitis and Proteus antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1988; 27 (suppl II): 72-85.

193. Ebringer H, Khalafpour S, Wilson C: Rheumatoid arthritis and Proteus: a possible aetiological association. *Rheumatol. Int.* 1989; 9: 223-228.
194. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA y col.: The ARA 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 315-324.
195. Boire G, López-Longo FJ, Ménard HA: Western-blotting of anti-Ro (SS-A) positive sera reveals at least two subsets. *Arthritis Rheum.* 1987; 30(4): 46(abstract A 53).
196. Ménard HA, Boire G, López-Longo FJ, Lapointe S, Larose A: A novel antigen-antibody system restricted to rheumatoid arthritis patients: The Sa system. *Arthritis Rheum.* 1989; 32(1): 8 (Abstract A 9 N).
197. Després N, Boire G, Ménard HA, Poole AR, Adams M: The rheumatoid arthritis specific Sa autoantigen is present in high concentration in the target tissue. *Arthritis Rheum.* 1992; 35(9) (suppl): s72.
198. Deprés N, Ménard HA, Boire G. Characterisation of two new antigen antibody systems (Sa/Ta) in patients with rheumatoid arthritis. 54th Annual Scientific Meeting. American College of Rheumatology. October 27th-November 1st. Seattle, Washington, 1990.
199. Després N, Boire G, Ménard HA: Sa/Ta and RA-33 are unrelated autoimmune systems of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1992; 19 (suppl 32): 39.
200. Rodríguez-Mahou M, López-Longo FJ, Escalona M, y col.: Significado clínico de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno Sa, una proteína de 48 kD presente en placenta y bazo humanos. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología. 29-31 de Octubre, La Coruña, 1991.

contrainmunolectroforesis utilizando el mismo extracto de timo de conejo. *Rev. Esp. Reumatol.* 1994; 21: 6-12.

211. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 1969; 102: 117-122.

212. Boire G, López-Longo FJ, Lapointe S, Ménard HA. Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60 kD Ro/SSA protein. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 722-730.

213. Rodríguez Mahou M, López Longo FJ, Lapointe N, Carreño L, Grau R, Gurbindo D, Fernández-Cruz E. Autoimmune phenomena in children with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 1994; 400: 31-34.

214. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

215. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976; 76: 4350-4354.

216. Griffiths D. Isolation of mitochondria and mitochondrial enzymes. *Protein purification methods*. Harris ELV, Angal S. IRL Press, Oxford, 1989, pp.108-109.

217. Graham J. Differential centrifugation. *Centrifugation*. Rickwood, D. IRL Press, Oxford., 1984, pp.167-174.

218. Schnaitman C, Erwin G, Greenwalt JW. The submitochondrial localization of monoamine oxidase. *J. Cell Biol.* 1967; 32(3): 719-735.

219. Kun E, Kirsten E, Piper WN. Stabilization of mitochondrial fractions with digitonin. En : Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in Enzymology* vol LV, p. 115-118, 1979.

220. Soper JW y Pedersen PL. Isolation of an oligomycin-sensitive ATPase complex from rat liver mitochondria. En : En : Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in Enzymology* vol LV p. 328-333, 1979.
221. Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA* 1949; 140: 659-662.
222. Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, et al. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 498-502.
223. Tan EM, Feltkamp TEW, Alarcón-Segovia D, et al. Reference reagents for antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:1331.
224. McIntyre JA, Faulk WP. Immunological aspects of human pregnancy. En : *Handbook of experimental immunology (4) : Applications of immunological methods in biomedical sciences.* D.M. Weir (ed). Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
225. Moreno AC, López-Longo FJ, Escalona M, et al. Renal amyloidosis and anti-Sa antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994; 24 (suppl 2): A27.