

VALOR CLÍNIC DELS ANTICOSSOS ANTINUCLEARS

R. MARQUET I PALOMER, M. VILARDELL I TARRÉS*

INTRODUCCIÓ

Els anticossos antinuclears constitueixen un grup heterogeni d'immunoglobulines amb especificitat antigènica dirigida contra una gran varietat de constituents macromoleculars del nucli cel·lular.

Tot i que la investigació de la cel·lula LE fou el primer mètode pràctic desenvolupat per detectar anticossos contra antigens cel·lulars¹, la tècnica universalment utilitzada actualment és l'adaptació que féu FRIOU² del mètode d'immunofluorescència indirecta per a la detecció d'antigens cel·lulars prèviament descrita per COONS i KAPLAN³. Com a resultat de la utilització sistemàtica d'aquesta tècnica sobre talls tissulars de ronyó o fetge de rata, es va posar de manifest que els sèrums de diferents pacients donaven lloc a distints patrons d'immunofluorescència nuclear. Els tres primers patrons d'immunofluorescència van ser descrits per BECK el 1961⁴, i el quart patró dos anys més tard per CASALS⁵. Aquests quatre patrons bàsics són l'homogeni, el clapat, el nucleolar i el reforç perifèric.

El mètode d'immunofluorescència indirecta, tot i que d'utilitat clínica indubtable, no ens proporciona cap mena d'informació immunoquímica, malgrat que els investigadors amb molta habilitat i amb experiència puguin relacionar les imatges de fluorescència amb sistemes antigen/anticòs diferents⁶. Generalment, això no obstant, només sembla que té un cert grau d'especificitat la detecció d'anticossos mitjançant la immunofluorescència sobre substrats especials, com la *Chritidia lucilae* per al DNA natiu⁷ i les línies cel·lulars cultivades en monocapa per al centròmer⁸. Per tant, si n'exceptuem aquests casos, els patrons d'immunofluorescència poden ser suggestius d'un tipus de sistema antigen/anticòs, però la identificació cal fer-la per mètodes més específics.

No hi ha cap tècnica ideal per a la determinació de la totalitat dels anticossos antinuclears i els diferents sistemes Antigen/anticòs s'han d'estudiar per mètodes distints⁹. El més utilitzat per a la detecció d'anticossos contra àcids nucleics és la ràdio-immuno-anàlisi. La tècnica de FARR, adaptada per WOLD el 1968¹⁰ solament detecta anticossos amb una alta avidesa per l'antigen; una altra modificació recent d'aquesta tècnica¹¹ pot permetre detectar anticossos anti-DNA d'alta i de baixa avideses. El grau d'avidesa dels anticossos anti-DNA i l'índex d'associació entre DNA-anti-DNA sembla estar relacionat amb l'activitat de la malaltia, així com la presència d'anticossos fixadors de complement¹², cosa que ha estat estudiada mitjançant tècniques de doble immunofluorescència¹³.

Per a la detecció d'anticossos dirigits contra antigens que es poden extreure del nucli s'ha utilitzat l'hemaglutina-

ció passiva¹⁴, sensible però limitada a pocs antigens a causa de la dificultat o l'alt cost de llur purificació, la doble fusió en agar (DUCHTERLONY)¹⁵, poc sensible, i la counter-immuno-electroferesi¹⁶, una mica més sensible que no la tècnica anterior.

Els mètodes més recents com la immunoanàlisi lligada a enzims (ELISA)¹⁷, amb una sensibilitat similar a la de la ràdio-immuno-anàlisi, cost menor i aplicació a un nombre més gran d'antigens, amb el temps poden arribar a ser tècniques d'ús estès per a la identificació de sistemes antigen/anticòs.

Malgrat les múltiples tècniques que s'han desenvolupat per a la identificació dels anticossos antinuclears és indubtable que la primera valoració de la presència d'anticossos en el sèrum d'un pacient s'ha de fer mitjançant el mètode de la immunofluorescència indirecta, si és possible sobre línies cel·lulars cultivades en monocapa, ja que semblen demostrar més sensibilitat que les seccions de teixits¹⁸, i permeten així mateix una millor identificació en alguns patrons com el nucleolar i el centromèric⁸.

*Especificitat antigènica dels anticossos antinuclears*NUCLEOPROTEINA
(o DESOXIRIBONUCLEOPROTEÏNA)

Els anticossos antinucleoproteïna reaccionen amb la totalitat de la substància nuclear i, en determinades circumstàncies, són els responsables que es produeixi el fenomen LE. Des que en 1959 HOLMAN va establir que l'antigen contra el qual va dirigit el factor LE és la nucleoproteïna DNA-histona¹⁹ s'han realitzat estudis múltiples per intentar esclarir la naturalesa de les molècules amb les quals reacciona aquest factor sense que s'hagi arribat a cap conclusió definitiva. S'ha demostrat que el factor LE no reacciona amb cap component de la desoxiribonucleoproteïna per separat²⁰, i es pot afirmar que l'estructura nativa és d'alguna forma necessària perquè es produeixi la unió amb el factor LE, sense que amb les dades existents es pugui excloure la possibilitat que més d'un determinant antigènic sigui el responsable de la formació de la cel·lula LE.

Els anticossos antinucleoproteïna donen lloc a un patró homogeni quan es realitza la tècnica de la immunofluorescència²¹, tot i que i ha algun cas descrit de lupus eritematos sistèmic amb anticossos antinucleoproteïna presents i anticossos antinuclears negatius⁹.

Tot i que la troballa de la cel·lula LE continua sent un criteri diagnòstic del lupus eritematos sistèmic²², la seva pràctica ha estat abandonada per molts laboratoris donada la dificultat de la tècnica i la subjectivitat de la interpretació. Com a prova clínica té uns altres desavantatges, com

* Departament de Medicina Interna. Hospital General de la Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.

pot ser la seva baixa sensibilitat ja que, com a màxim, és positiva en el 70% dels pacients amb lupus eritematos sistèmic, i que pot ser positiva en altres malalties sistèmiques com l'artritis reumatoide i l'hepatitis crònica activa²³. D'altra banda, la presència de la cèl.lula LE tampoc no ens permet diferenciar el lupus eritematos sistèmic del discoides o de l'induït per fàrmacs, sobretot en el darrer cas en què arriba a un percentatge de positivitats tant alt com en el sistèmic²⁴.

DNA

Els anticossos anti-DNA formen un grup heterogeni d'anticossos dirigits contra diferents determinants antigènics de la molècula de DNA²⁵, dels quals hi ha almenys tres grups:

1. Anti-DNA natiu: van adreçats contra el DNA bicatenari (dsDNA) i sembla que el determinant antigènic està en relació amb l'estructura en doble hèlice del DNA. Aquest tipus d'anticossos anti-DNA sembla ser característic dels pacients amb lupus eritematos sistèmic²⁶, tot i que no són absolutament específics, ja que s'han trobat també en pacients afectes d'hepatitis crònica activa, malaltia mixta del teixit connectiu i miastènia gravis^{9,27}.

2. Anti-DNA monocatenari i bicatenari: s'ha establert que una part important del determinant antigènic contra el qual van adreçats aquests anticossos és la desoxiribosa-fosfat del DNA, ja que no presenten relació creuada amb el RNA. Estan presents a títol alt en el lupus eritematos sistèmic i, a títol baix, en altres malalties reumatològiques²⁸. En la immunofluorescència acostumen a donar lloc a un patró de reforç perifèric²⁹.

3. Anti-DNA monocatenari (ss-DNA): aquests anticossos reaccionen amb determinants antigènics relacionats amb purines i primidines dels àcids nucleics presentant, per tant, reacció creuada amb el RNA³⁰. Es detecten en una munió de malalties autoimmunes, sent considerats inespecífics. Això no obstant, recentment s'ha descrit un subgrup de pacients amb lupus eritematos sistèmic i predominança de lesions cutànies que presenten anticossos anti-DNA natiu i antinuclears negatius i anti-DNA monocatenari present³¹.

El problema més gran que es planteja en relació amb els anticossos anti-DNA és que és pràcticament impossible estar segur que la molècula de DNA és absolutament nativa, ja que sovint es desnatura. Aquest problema sembla que ha quedat resolt amb el mètode d'immunofluorescència sobre la *Crithidia lucilae*, que permet, a més, estudiar el tipus d'immunoglobulina anti-DNA present en el sèrum del pacient i determinar la seva capacitat de fixar el complement o de no fixar-lo, la qual cosa està en relació amb l'activitat de la malaltia³¹.

HISTONES

Els anticossos anti-histones, les proteïnes bàsiques que formen complex amb el DNA en el nucli cel.lular, havien estat detectats fa anys en sèrums de pacients afectes de lupus eritematos sistèmic mitjançant la tècnica de fixació del complement³², tot i que amb aquesta tècnica la incidència era molt baixa, probablement degut a l'activitat anti-complementària de les histones. En introduir la immunofluorescència com a mètode de detecció dels anticossos

anti-histona es va comprovar que aquests es trobaven presents en el 30% de lupus eritematos sistèmic i en el 95% de lupus induït per fàrmacs³⁴. Darrerament s'ha utilitzat la tècnica de la ràdio-immuno-anàlisi en fase sòlida³⁵, la qual ha permès demostrar que el 30-50% dels pacients amb lupus eritematos sistèmic posseeixen anticossos anti-histona amb una activitat predominant enfront de les fraccions H2A i H2B unides³⁶, sense que s'hagi pogut esclarir el significat d'aquestes troballes.

D'altra banda, sembla que el lupus induït per procaina-mida tendeix a relacionar-se amb el complex H2A-H2B, mentre que el produït per hidralacina es relaciona amb H3-H4³⁴.

S'ha observat que aquests anticossos produeixen un patró homogeni en la immunofluorescència i, malgrat la seva relació estreta amb el lupus eritematos idiopàtic o induït per fàrmacs, s'han trobat en altres processos com l'artritis reumatoide i l'esclerodèrmia³⁵.

ANTÍGENS QUE PODEN SER EXTRETS DEL NUCLI

Els antigens que poden ser extrets del nucli formen un gran grup de macromolècules que actualment tendeixen a ser englobades sota la denominació d'antigens nuclears proteïcs no histones, i que són extrets de la fracció salina soluble del nucli³⁷. Generalment, es tracta de proteïnes principalment àcides, tot i que algunes són bàsiques, la majoria de les quals són petites partícules de ribonucleoproteïna compostes per molècules de RNA nuclear o citoplasmàtic unit a proteïnes³⁸.

Els anticossos anti-ENA produeixen generalment un patró clapat en la immunofluorescència³⁹. Per a la seva identificació s'han utilitzat una munió de tècniques, extraient els antigens de timus de vedella o de conill, cèl.lules limfoides i homogeneïtzat de fetge i melsa humans³⁷. Fins ara s'han identificat un gran nombre d'aquests antigens, per la qual cosa revisarem només els que puguin tenir un significat clínic.

nRNP: L'antigen nRNP fou identificat el 1972 per SHARP⁴⁰ i associat a una nova entitat la qual anomenà malaltia mixta del teixit connectiu (MCTD). Aquest antígen, tot i que ha estat trobat en sèrums de pacients afectes d'altres malalties reumatològiques i alguns autors creuen que no és específic³⁰, quan es troba a títols molt alts sembla que és altament específic de la MCTD⁴².

Tanmateix, cal assenyalar que encara avui hi ha autors que consideren la MCTD com un subgrup d'un procés definit, com el lupus eritematos sistèmic, l'esclerodèrmia o la dermatomiositis. De fet, en una revisió de 15 dels primers 25 pacients descrits per SHARP⁴³, al cap de 3-10 anys han evolucionat fins que han presentat manifestacions més definides d'esclerosi sistèmica progressiva.

Sm: L'antigen Sm és un altre dels principals constituents dels antigens que poden ser extrets del nucli. Fou descrit per TAN el 1966 en tres pacients afectes de lupus eritematos sistèmic¹⁵, sent posteriorment caracteritzat per immunodifusió, que va permetre separar aquest antígen, RNasa resistent, del nRNP, RNasa sensible⁴³.

Els anticossos anti-Sm es troben quasi exclusivament en pacients amb lupus eritematos sistèmic⁴⁴, sent considerats com un dels criteris diagnòstics de la malaltia²². La seva incidència és d'un 24% del total de pacients amb lupus eritematos sistèmic, i es troben més sovint (66%) en

els que presenten un patró clapat en la immunofluorescència¹⁶.

Hi ha una gran controvèrsia en relació amb les correlacions clíniques dels anticossos anti-Sm³⁰. Mentre que uns autors l'han relacionat amb una menor incidència d'afectació renal i del sistema nerviós central⁴⁵, altres no confirmen aquestes troballes^{41,44}.

PM-1, Mi-1, Jo-1: Aquests tres sistemes antigènics estan relacionats amb la polimiositis de l'adult. El primer d'ells el PM-1, fou descrit per WOLFE el 1977, el qual el trobà en el 70% de pacients amb polimiositis i en el 95% de pacients amb clínica mixta de polimiositis i esclerodèrmia⁴⁶.

L'anticòs contra l'antigen Jo-1 s'ha trobat en el 30% de les polimiositis i en el 5% de les dermatomiositis i síndromes overlap⁴⁷. Recentment s'ha relacionat la presència d'aquest anticòs amb l'afectació pulmonar de la polimiositis⁴⁸.

Sc1-70: Aquest antigen, aïllat per primera vegada el 1975 per TAN⁴⁹, sembla que és constituït per una proteïna cromosòmica bàsica unida a la cromatina⁵⁰.

L'anticòs anti-Sc1-70 és altament específic de l'esclerodèrmia, ja que es troba en el 13% de pacients afectes de síndrome CREST i en el 23% de pacients afectes d'esclerodèrmia difusa, i es troba molt rarament en pacients amb fenomen de RAYNAUD i síndrome de SJÖGREN sense que s'hagi trobat en altres malalties sistèmiques³. La baixa incidència d'aquest anticòs en pacients amb esclerodèrmia s'ha atribuït a la poca sensibilitat de la tècnica utilitzada per a detectar-lo.

SS-A i SS-B: Els antigens SS-A i SS-B van ser identificats per ALSPAUGH el 1975⁵¹ i associats principalment a la síndrome de SJÖGREN, tant primari com associat a altres malalties.

Posteriorment es va demostrar, a través d'estudis d'immunodifusió, que els anticossos anti-SS-A tenen línies d'identitat amb els anti-Ro descrits el 1965⁵² i els anticossos anti-SS-B amb els anti-La (o anti-Ha) descrits el 1974⁵³ tot i que, això no obstant, algunes de les seves característiques físico-químiques són diferents⁵⁴. Cal tenir en compte que, tot i que els antigens Ro i La hagin estat identificats amb els antigens SS-A i SS-B, no són antigens nuclears sinó citoplasmàtics i no es detecten mitjançant tècniques d'immunofluorescència.

L'anticòs anti-SS-A ha estat trobat en el 64% de pacients amb lupus eritematos sistèmic, caracteritzant un subgrup que presenta fenomen de RAYNAUD, trombopènia i Coombs positiu⁵⁵. D'altra banda, en pacients amb síndrome de SJÖGREN la presència d'anti-SS-A sembla que va associada a manifestacions extraglandulars (vasculitis, púrpura i limfadenopatia), alteracions hematològiques (anèmia, leucopènia i trombopènia) i alteracions serològiques (anticossos antinuclears, factor reumatoide, crioglobulines i hipocomplementèmia)⁵⁶.

Els anticossos anti-SS-B tenen una gran especificitat per a la síndrome de SJÖGREN, bé aïllat (68%), bé associat a lupus eritematos sistèmic (73%)^{55,57}.

RANA: En l'estudi d'ALSPAUGH del 1975, en el qual es descriuen els antigens SS-A i SS-B, fou descrit un tercer sistema, el SS-C, que es trobava en pacients afectes d'artritis reumatoide, amb síndrome de SJÖGREN o sense aquesta síndrome⁵¹. Per tant, aquest antigen fou anomenat posteriorment RANA (antigen nuclear de l'artritis reuma-

toide) i el seu anticòs RAP (precipitina de l'artritis reumatoide)⁵⁸.

Aquest anticòs és detectat solament en substrat Wil-2 (limfòcits humans infectats per virus d'EPSTEIN-BARR) o en teixit reumatoide infectat per aqueix virus⁵⁹, la qual cosa ha obert un camp d'investigació sobre la patogènia de l'artritis reumatoide.

Utilitzant com a substrat cèl·lules de Raji (també infectades per virus d'EPSTEIN-BARR) es troba anticòs anti-RANA en el 93% de pacients amb artritis reumatoide seropositiva i en el 95% de pacients amb artritis reumatoide seronegativa⁶⁰.

ANTÍGENS NUCLEOLARS

El patró de fluorescència nucleolar és el que es troba amb menys freqüència, i habitualment el trobem associat a un altre tipus de patró. Per aquest motiu, si per a la detecció d'anticossos utilitzem substrats de talls de teixit, es troba patró nucleolar solament en el 0,7% de sèrums positius⁶¹, que pertanyen a pacients afectes d'esclerosi sistèmica progressiva en el 54% dels casos i de lupus eritematos sistèmic en el 26%. No obstant això, utilitzant substrats de línies cel·lulars cultivades en monocapa, es troben anticossos antinucleolars en el 40% dels pacients afectes d'esclerodèrmia⁶². Malgrat que es troba en altres malalties reumàtiques, els títols alts d'aquests anticossos s'associen amb esclerodèrmia o síndrome de RAYNAUD, tot i que el seu significat clínic és desconegut⁶³.

No s'han efectuat gaires estudis per caracteritzar els antigens nucleolars, tot i que hi ha dades que suggereixen una relació amb el RNA, ja que la immunofluorescència és abolida per la RNasa. S'han identificat anticossos contra un tipus de RNA de baix pes molecular (4S-6S), que podria tenir una localització exclusivament nucleolar⁶⁴. Això no obstant, els diferents patrons d'immunofluorescència nucleolar que es poden observar suggereixen que en el sèrum antinucleolar hi ha més d'un tipus d'anticòs.

ANTICOSSOS CONTRA ALTRES ANTÍGENS INTRACEL·LULARS

La utilització dels substrats de línies cel·lulars cultivades en monocapa per a la detecció d'anticossos antinuclears mitjançant immunofluorescència ha permès la identificació de nous tipus d'anticossos fins aleshores desconeguts, bé per una manca d'antigenicitat necessària en el substrat, bé per manca d'accessibilitat d'algunes estructures antigèniques del nucli cel·lular.

Centròmer: Aquests anticossos van ser identificats el 1979 per MORI⁶⁵ en el sèrum de cinc pacients afectes de síndrome CREST, anomenant clapat discret al patró d'immunofluorescència a que donen lloc.

Aquests anticossos es troben en una alta proporció en els pacients afectes de síndrome CREST, al qual diversos autors atribueixen valor de marcador serològic⁶⁵. Aquest anticòs podria tenir també un valor pronòstic ja que, quan es troba en pacients afectes d'esclerodèrmia difusa, rarament és acompanyat de manifestacions visceral⁶⁶.

D'altra banda, en pacients afectes de fenomen de RAYNAUD, la presència d'anticossos anticentròmer pot predir manifestacions posteriors de malaltia sistèmica, principalment l'esclerodèrmia⁶⁷.

MSA: El 1981 es va descriure aquest anticòs dirigit contra el centríol i els microtúbuls del fus acromàtic⁶⁸. Els escassos pacients en els quals s'ha trobat aquest anticòs

estaven afectes de malalties sistèmiques, i la meitat d'ells presentava sovint una síndrome de túnel carpià com a manifestació inicial.

Centriol: Els anticossos anticentriol van ser observats el 1980⁶⁹ en pacients amb connectivopaties no etiquetades. Posteriorment, OSBORN els va identificar en un pacient amb esclerodèrmia⁷⁰.

L'anticòs anticentriol s'ha observat en ocasions molt rares i es desconeix el seu significat clínic.

CONCLUSIÓ

Actualment, davant la sospita d'una malaltia sistèmica, el mètode de rutina utilitzat per a la detecció d'anticossos antinuclears és la immunofluorescència indirecta, utilitzant preferentment com a substrat linies cel·lulars en cultiu. Si aquesta prova és positiva i, basant-nos en dades clíniques i en els diferents patrons d'immunofluorescència, podem determinar l'especificitat de l'anticòs antinuclear mitjançant altres tècniques com l'hemaglutinació, la ràdio-immuno-anàlisi, la immunofluorescència sobre *Christidia luciliae*, la compte-immuno-electroferesi, etc.

La troballa d'un anticòs específic ens proporcionarà en algunes ocasions la confirmació diagnòstica, com en el cas dels anti-Sm i anti-ds-DNA per al lupus eritematosus sistèmic, o de l'anti-Scl-70 i anticentromer en l'esclerodèrmia; d'altres vegades ens donarà informació sobre el pronòstic, com en el cas del Jo-1 i l'afectació pulmonar de la polimiositis o de l'anticentromer en el fenomen de RAYNAUD i l'esclerodèrmia; finalment, ens poden permetre la monitorització clínica de l'activitat de la malaltia, com els anti-ds-DNA en el lupus eritematosus sistèmic.

BIBLIOGRAFIA

- HARGRAVES, MH., RICHMOND, H., MORTON, R.: Presentación of two bone marrow elements: the tart cell and "LE" cell. *Proc. Staff Mayo Clin.* 1948; 23: 25-28.
- FRIOU CJ: Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using antibody technique. *J. Clin. Invest.* 1957; 36: 890-893.
- COONS, A., KAPLAN M.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 1950; 91: 13-16.
- BECK, J.S.: Variations in the morphological patterns of "autoimmune" nuclear fluorescence. *Lancet* 1961; 1: 1.203-1.205.
- CASALS, SP., FRIOU, GJ., TEAQUE, PD.: Specific nuclear reaction patterns of antibody to DNA in lupus erythematosus sera. *J. Clin. Lab. Med.* 1963; 62: 625-631.
- BURNHAM, TK.: Antinuclear antibodies. II. The prognostic significance of nuclear immunofluorescent patterns in lupus erythematosus. *Arch. Dermatol* 1975; 111: 203-207.
- AARDEN, LA., DeGROOT, ER., FELTKAMP, TEW.: Immunology of DNA. III. *Christidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-ds-DNA with the immunofluorescence technique. *Ann NY Acad Sci* 1975; 254: 505-571.
- TAN, EM., RODMAN, GP., GARCIA, I., MOROL, Y., FRITZLER, MJ., PEEBLES, C.: Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1980; 23: 617-625.
- ALARCÓN, SEGOVIA, D.: Antibodies to nuclear and other intracellular antigens in the connective tissue diseases. *Clin. Rheum Dis.* 1983; 9: 161-175.
- WOLD, RT., YOUNG, FE., TAN, EM., FARR, RS.: Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid. *Science* 1968; 161: 806-810.
- SMEENK, R., VAN DER LELIG, G., SWAAK, T.: Specificity in systemic lupus erythematosus of antibodies to double stranded DNA measured with the polyethylene glycol precipitation assay. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 631-638.
- PIGRAU, C., GUARDIA, J.: Anticuerpos antinucleares. *Med. Clin. Barcelona* 1983; 80: 850-858.
- STEIGERWALD, JC., PEEBLES, D.: Clinical significance of high levels of native DNA antibodies. *Rev. Rhum Suppl.* 1981; Abstr 0616.
- STAVITSKY, AB.: Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol* 1954; 72: 360-367.
- TAN, EM., KUNKEL, HG.: Characteristics of soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 1966; 96: 464-471.
- KURATA, N., TAN, EM.: Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 574-80.
- NAKANE, PK., PIERCE, GB.: Enzyme labeled antibodies. Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem Cytochem* 1966; 14: 929-931.
- LIPSCOMB, MF., GILLIAM, JN., CHUBICK, A.: Fluorescent antinuclear antibodies. *Am. J. Clin. Pathol* 1980; 76: 243.
- HOLMAN, H., DEICHER, HR.: The reaction of the lupus erythematosus (LE) cell factor with deoxyribonucleoprotein of the cell nucleus. *J. Clin. Invest* 1959; 28: 2.058-2.072.
- TAN, EM.: An immunologic precipitin system between soluble nucleoprotein and serum antibody in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest* 1967; 46: 735-745.
- CASALS, SP., FRIOU, GJ., MYERS, LL.: Significance of antibody to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1964; 7: 359.
- TAN, EM., COHEN, AS., FRIES, JF.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1.271-1.277.
- FERNÁNDEZ, MADRID, F., MATTIOLI, M.: Antinuclear antibodies (ANA): Immunologic clinical significance. *Semin Arthritis Rheum* 1976; 6: 83-124.
- ALARCÓN, SEGOVIA, D., WAKIM, KG., WORTHINGTON, JW., WARD, LE.: Clinical and experimental studies on the hyalaline syndrome and its relationship to systemic lupus erythematosus. *Medicine* 1967; 46: 33-43.
- CHUBRICK, A.: DNA antibodies in systemic lupus erythematosus and pseudolupus syndrome. *ADV Intern. Med.* 1980; 26: 467-487.
- ARANA, R., SELINGMANN, M.: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1967; 46: 1.867-1.882.
- SMEENK, R., VAN DER LELIG, G., AARDEN, L.: Avidity of antibodies to ds-DNA: comparison of IFT on *Christidia luciliae*, Farr assay and PEG assay. *J. Immunol* 1982; 128: 73-78.
- NOTMAN, DD., KURATA, N., TAN, EM.: Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic disease. *Ann. Intern. Med.* 1975; 83: 464-469.
- TAN, EM.: Antinuclear antibodies and the LE cell phenomenon. in COHEN AS Rheumatology and Immunology pp 80-85. GRUNE & STRATTON Inc. Nova York 1979.
- KOFFLER, D., KUNKEL, HG.: Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease. *J. Exp. Med.* 1971; 134: 294-312.
- MADDISON, PJ., PROVOST, TT., REICHLIN, M.: Serological findings with ANA negative systemic lupus erythematosus. *Medicine* 1980; 60: 87-94.
- PIGRAU, C.: Estudio de los anticuerpos anti-DNA nativo mediante la técnica de la *Christidia luciliae*. Tesis doctoral. Barcelona 1982.
- STOLLAR, BD.: Varying specificity of SLE sera for histone fractions and periodate-sensitive antigen associated with histone. *J. Immunol* 1969; 103: 804-808.
- FRITZLER, MJ., TAN, EM.: Antibodies to histones in drug induced and idiopathic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1978; 62: 560-567.
- RUBIN, RL., JOSLIN, FG., TAN, EM.: A solid phase radioimmunoassay for antihistone antibodies in human sera: comparison with an immunofluorescence assay. *Scand J. Immunol* 1982; 15: 63-70.
- RUBIN, RL., FENNEKE, GJ., TAN, EM.: Specificity of anti-histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 779-82.
- MOORE, TL., WEISS, TD., NEUCKS, SH., BALDASSARE, AR., ZUCKNER, J.: Extractable nuclear antigens. *Sem Arthritis Rheum* 1981; 10: 309-318.
- LENER, EA., LENER, MR., JANEWAY, CA., STEITZ, JA.: Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 2.737-2.741.
- NORTHWAY, JD., TAN, EM.: Differentiation of antinuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence. *Clin. Immunol Immunopathol* 1972; 1: 140-154.
- SHARP, GC., IRVIN, WS., TAN, EM., GOULD, RG., HOLMAN, HR.: Mixed connective tissue disease - an apparently distinct rheumatic disease

- syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 1972; 52: 148-159.
41. MUNYER, EF., SCHUR, PH.: Antibodies to Sm and RNP. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 848-853.
 42. SHARP, GC.: Anti-nRNP and anti-Sm antibodies. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 757-760.
 43. REICHLIN, M., MATTIOLI, M.: Correlation of a precipitin reaction to an Rna protein antigen and low prevalence of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 1972; 286: 908-911.
 44. BARADA, FC., ANDREWS, B.S., DAVIDS, JS., TAYLOR, RP.: Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation of Sm antibody titres with disease activity and other laboratory parameters. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1.236-1.244.
 45. WINN, DM., WOLFE, JF., LINDBERG, DA., FRISTDE, FH., KINGSLAND, L., SHARP, GC.: Identification of a clinical subset of systemic lupus erythematosus by antibodies to the Sm antigen. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 1.334-1.337.
 46. WOLFE, JF., ADELSTEIN, E., SHARP, GC.: Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. *J. Clin. Invest.* 1977; 59: 176-178.
 47. NISHIKAI, M., REICHLIN, M.: Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis: classification of the Jo-1 antibody system. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 881-888.
 48. YOSHIDA, S., AKIZUKI, M., MIMORI, T., YAMAGATA, H., INAGA, S., HOMMA, M.: The precipitating antibody to an acidic nuclear protein antigen, the Jo-1, in connective tissue diseases. A marker for a subset of polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 604-611.
 49. TAN, EM., RODMAN, GP.: Report of an antigen present in scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 1975; 18 (Suppl): 430.
 50. DOUVAS, A., ACHTEN, M., TAN, EM.: Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 10.514-10.522.
 51. ALSPAUGH, M., TAN, EM.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren syndrome. *J. Clin. Invest.* 1975; 55: 1.067-1.073.
 52. CLARK, G., REICHLIN, M., TOMASI, T.: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with the sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 1969; 102: 117-122.
 53. MATTIOLI, M., REICHLIN, M.: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus; description of a cytoplasmic non ribosomal antigen. *Arthritis Rheum* 1974; 17: 421-429.
 54. AKIZUKI, M., POWERS, R., HOLMAN, H.: A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* 1977; 59: 264-272.
 55. HARMON, C., PEEBLES, C., TAN, EM.: Disease specificity of the SS-A antibody. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 688.
 56. ALEXANDER, EL., ARNETT, FC., PROVOST, TT., STEVENS, MB.: Sjögren's syndrome: association of anti-Ro (SS-A) antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities and serologic hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 1983; 98: 155-159.
 57. MARTÍNEZ-LAVIN, V., VAUGHAN, JH., TAN, EM.: Autoantibodies and the spectrum of Sjögren syndrome. *Ann Intern. Med.* 1979; 91: 185-190.
 58. ALSPAUGH, M., TALAL, N., TAN, EM.: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 216-222.
 59. ALSPAUGH, MA., JENSEN, FC., RABIN, H., TAN, EM.: Lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus: induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 1978; 147: 1.018-1.027.
 60. NG, KC., PERRY, JD., BROWN, KA., HOLBORROW, EJ.: Anti-RANA antibody: a marker for seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Lancet* 1980; 1: 447-449.
 61. RITCHIE, RF.: Antinuclear antibodies: their frequency and diagnostic association. *N. Engl. J. Med.* 1970; 282: 1.174-1.177.
 62. MOROI, Y., PEEBLES, C., FRITZLER, MJ., TAN, EM.: Complexity of antinuclear antibodies in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 640.
 63. LEMAIRE, V., CUNA, J., RYCKEWAERT, A., PELTIER, AP.: Les anticorps antinucleaires: caractères immunologiques et correspondance clinique. *Rev. Rhum Mal Osteoartic* 1979; 46: 383-387.
 64. PINNAS, JL., TAN, EM.: Antinuclear antibodies in human sera. *J. Immunol.* 1973; 111: 996-1.004.
 65. MCCARTY, GA., RICE, JR., BEMBE, ML., BARADA, FA.: Anticentromere antibody. Clinical correlations with favorable prognosis in patients with scleroderma variants. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 1-7.
 66. MEYER, O., HAIM, T.: Les anticorps anticentromère. Valeur diagnostique et pronostique. *Nouv. Presse Med.* 1982; 11: 2.891-2.894.
 67. KALLENBERG, CG., PASTOOR, GW., WOUDE, AA., THE, TH.: Antinuclear antibodies in patients with Raynaud's phenomenon: clinical significance of anticentromere antibody. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 382-387.
 68. MCCARTY, GA., VALENCIA, DW., FRITZLER, MJ., BARADA, FA.: A unique antinuclear antibody staining only mitotic-spindle apparatus. *N. Engl. J. Med.* 1981; 305: 703.
 69. COX, JV., SCHENK, DA., OLMSTED, JB.: Human antibodies to centromeric proteins. *J. Cell Biol.* 1980; 87: 1.825.
 70. OSBORN, TG., PATEL, NJ., ROSS, PC., BAUER, NE.: Antinuclear antibody staining only centrioles in a patient with scleroderma. *N. Engl. J. Med.* 1982; 307: 253-254.

Ann Med (Barc), 1984, 70: 173-177