

Aplicación clínica de los anticuerpos en lupus eritematoso sistémico

Gerardo Quintana López¹, Andrés Fernández Aldana², José Félix Restrepo³,
Adriana Rojas⁴, Paul Méndez P.⁵, Federico Rondón H.⁶, Álvaro Sánchez⁷,
Antonio Iglesias Gamarra⁸

Resumen

En la práctica diaria, el médico tiene como uno de los retos frente a un paciente el establecer un diagnóstico, y quisiera tener una prueba o ayuda diagnóstica 100% sensible y específica para corroborar su diagnóstico de trabajo. Sin embargo, esto es infrecuente en la consulta reumatológica, es por esto que presentamos en este artículo una visión detallada sobre el uso y significado clínico de los anticuerpos más utilizados en la valoración inicial y seguimiento de los pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Palabras clave: Lupus eritematoso sistémico, anticuerpos antinucleares, aplicación clínica.

Summary

In clinical practice, a challenge for the the physicians is to do a precise diagnostic to the patients, and they would like to have a diagnostic test 100% sensitive and specific to probe they probable diagnostic However, it is unusual in the rheumatology consultation. In this paper we present a complete review about the use and clinical significance of auto antibodies more frequent

used in the initial evaluation and follow up of patients with systemic lupus erythematosus.

Key words: Systemic lupus erythematosus, antinuclear antibodies, clinical utilities.

Introducción

En las enfermedades reumáticas, es posible encontrar en el paciente una gran variedad de anticuerpos dirigidos contra diferentes estructuras celulares propias, y es sin duda el lupus eritematoso sistémico (LES) el que mayor variedad tiene en la presencia de dichos anticuerpos, muchos de ellos sin poderse determinar y sin establecerse aún su utilidad, por el momento, en la práctica diaria, y son sin duda los anticuerpos antinucleares (ANAS), junto a los anticuerpos contra DNA y anticuerpos contra antígenos extractables (ENAS) los que han sido motivo de mayor estudio y son, por lo tanto, pilar fundamental en el estudio de los pacientes con LES.

A pesar de haberse reconocido a la fecha más de 50 autoantígenos blanco de anticuerpos en pacientes con LES, se sabe que solamente unos pocos serán detectables en la práctica clínica¹, y lo más importante, deben estar en la mente del clínico si se está en presencia de un paciente con sospecha de una enfermedad reumatológica y en este caso ante un paciente con sospecha de LES, ya que es posible encontrar la presencia de estos anticuerpos en población sana, en la mayoría de los casos en títulos bajos,

1-2 Médicos Internistas. Residentes de primer año de Reumatología, Universidad Nacional de Colombia.

3 Internista y Reumatólogo. Profesor Asociado. Facultad de Medicina. Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia. Coordinador Unidad de Reumatología.

4-5 Médicos reumatólogos. Universidad Nacional de Colombia

6 Internista y Reumatólogo, Facultad de Medicina, Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.

7 Internista y Reumatólogo. Profesor Asociado. Facultad de Medicina. Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.

8 Internista y Reumatólogo. Profesor Titular. Facultad de Medicina. Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.

Enviado para publicación: Febrero 5/2003;
Aceptado en forma revisada: Febrero 26/2003

ya que su presencia indica una respuesta inmunológica y no necesariamente una enfermedad².

De otra parte, resulta primordial para la adecuada correlación clínica frente a un paciente con una probable enfermedad del colágeno, recordar que existen diferentes patrones con diferente especificidad y sensibilidad de acuerdo con la prueba inmunológica realizada (inmunofluorescencia –IFI-, inmunodifusión, ELISA, etc.) que van a orientar a determinada patología, siempre recordando que el método diagnóstico básico es una historia clínica completa y un adecuado examen físico.

Pruebas diagnósticas de los anticuerpos antinucleares y procesos diagnósticos en epidemiología

Naomar de Almeida Filho expresa lo siguiente: “Una prueba diagnóstica es una herramienta científica que intenta transformar una forma subjetiva del conocimiento en un concepto”³. Las pruebas de laboratorio inmunológicas, especialmente los anticuerpos antinucleares, tienen un papel crítico en el cuidado de pacientes con enfermedades reumáticas. Históricamente como lo hemos analizado, estas pruebas pueden ayudar a definir las bases inmunopatofisiológicas de varias enfermedades reumáticas y precisar la clasificación de distintas enfermedades que tienen solapamiento de algunos hechos clínicos y permiten el abordaje para el diagnóstico de varias enfermedades.

Consideramos que la prueba diagnóstica más importante en la medicina es la historia clínica, por ello las pruebas diagnósticas cuantitativas clasifican a los pacientes como enfermos o libres de la enfermedad sobre la base de si ellos caen arriba o abajo de una cifra de corte preseleccionada y que es conocida como criterio de positividad, valor crítico o valor de referencia. Una prueba diagnóstica es aquella que se realiza durante el periodo de estudio; aquellas que se hacen a posteriori (durante el seguimiento) se llaman prueba pronóstica. Una prueba diagnóstica es el resultado de la medición de cualquier variable, de cualquier índole, percibida a través de modelos sentidos en el transcurso del ejercicio médico³. Cualquiera que sea dicha variable es susceptible de ser medida en sus capacidades diagnósticas para una enfermedad o desorden. El ejercicio diagnóstico se cultiva para detectar cada vez con

mayor precisión y exactitud indicios más precoces en los espectros preclínicos, clínico y patológico de las enfermedades, y la clave en la interpretación de las pruebas diagnósticas es calcular a qué probabilidad de la enfermedad corresponde el hallazgo clínico o paraclinico³. En consecuencia, el diagnóstico de una enfermedad (que no es otra cosa que el valor predictivo positivo), es el producto de dos probabilidades: la probabilidad pre-prueba del paciente antes de realizar una nueva prueba, por la razón de probabilidades (Likelihood ratio, en inglés) que ostenta el resultado de esa nueva prueba³.

Actualmente, de acuerdo con los conceptos introducidos por David L Sackett y sus colaboradores como Jaeschke, Guyatt y otros que vienen publicando desde 1994 varios artículos en la revista JAMA de cómo orientar las pruebas diagnósticas, para que los resultados tengan cierta validez, de acuerdo con los conceptos de medicina basada en la evidencia. Por ello el dominio del proceso diagnóstico estriba en dos aspectos fundamentales: la estimación adecuada de probabilidades, preprueba en cada paciente y el conocimiento del rendimiento operativo (sensibilidad y especificidad) resumido en sus razones de probabilidades de cada una de las pruebas relacionadas con la condición adecuada³⁻⁹.

Analizando los conceptos de los textos de David L. Sackett y Cols¹⁰, del libro de Edgar R Black y Cols¹¹, y del libro de Estrategias de investigación en medicina clínica de Enrique Ardila, Ricardo Sánchez y de Jairo Echeverry³, y sobre todo las guías para el uso de las pruebas inmunológicas como los anticuerpos antinucleares de los profesores Daniel H Solomon, Arthur J, Kavanaugh, Peter H Schur¹² y del comité Ad Hoc de la ACR¹³ que se publicó en Arthritis Care Research en agosto 15 de 2002, hemos querido recopilar, en forma resumida, la aplicación de estos conceptos modernos en los anticuerpos antinucleares:

Uso adecuado de los anticuerpos antinucleares

1. Papel crítico en el cuidado de los pacientes con enfermedades reumáticas.
2. Algunas pruebas (“Tests”) definen la base inmunopatogénica de varias enfermedades reumáticas y permiten precisar la clasificación de las diferentes enfermedades reumáticas con aspectos clínicos similares.

3. Los resultados de las pruebas inmunológicas podrían ser la llave esencial para el diagnóstico de varias enfermedades.
4. Las pruebas inmunológicas pueden proveer información relevante relacionada con: actividad de la enfermedad, algunos órganos de choque, pronóstico, monitoreo de la actividad y respuesta al tratamiento¹⁵⁻¹⁶.

Uso inadecuado de los anticuerpos antinucleares

1. Aplicación inadecuada, puede resultar en un diagnóstico equivocado.
2. Condicionar un gasto de salud costoso e innecesario.
3. Para evitar el uso inadecuado de las pruebas inmunológicas se deben realizar guías orientadas al uso racional de las pruebas¹⁵⁻¹⁶.

Guías para las pruebas

I. Definición de la prueba

II. Indicaciones para el uso de la prueba

A. Diagnóstico

1. Cuál es la prevalencia de una prueba positiva en el LES, otras enfermedades reumáticas autoinmunes, otras enfermedades reumáticas sin mediación inmune y en controles sanos.
2. Cuáles son las estadísticas de la población – sobre la prueba [sensibilidad (S), especificidad (E), razón de probabilidades (LR)].
3. Cuál es el título para la población estudiada.
4. Cuál es la ayuda para el diagnóstico.

B. Pronóstico

1. Correlación con la actividad de la enfermedad, órgano blanco, evolución, supervivencia.
2. Estadística de la población sobre el pronóstico.
3. Relación del título y del pronóstico.
4. La prueba si puede ayudar para la determinación del pronóstico.

C. Contribuciones – (Longitudinales)

1. Qué condiciones cambian con la realización de la prueba.

2. Qué efectos sobre la prueba se realizaron a través del tratamiento, posterior a la realización de las pruebas de los anticuerpos antinucleares.

III. Historia

A. Célula L.E.

Fue la primera prueba de laboratorio disponible para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico. Para muchos pacientes con lupus la prueba de células LE es negativa y otros pacientes con algunas otras enfermedades la prueba puede ser positiva. Esto planteó el desarrollo de pruebas de mayor sensibilidad y especificidad. Por lo que se mejoró la sensibilidad y especificidad de la prueba con el desarrollo de otros métodos diagnósticos¹²⁻¹⁴.

B. Sensibilidad y especificidad de las nuevas pruebas.

IV. Métodos diagnósticos

1. Inmunofluorescencia

2. Sustrato

3. Líneas

4. Inmunodifusión

5. Contrainmunolectroforesis

6. Hemaglutinación

7. Elisa

8. Radioinmunoensayo

1. Purificación parcial del antígeno nuclear

a. Purificación total

b. Técnicas recombinantes

2. Pruebas en los controles sanos y familiares

a. CONTROLES SANOS (7 artículos, nivel de evidencia tipo I, grado de recomendación A (es decir que cumplen 5 criterios de acuerdo con la medicina basada en la evidencia), se analizaron para controles sanos).

• Datos: Algunos controles sanos tienen:

– ANA: Títulos bajos

– 1:40 = 25-30%

– 1:80 = 10-15%

– 1:160 \pm 5% En las mujeres se pueden incrementar los títulos de los anticuerpos con la edad.

- b. RELACIONADOS/FAMILIARES (9 artículos, de los cuales 6 artículos con nivel de evidencia tipo I, grado de recomendación A y 3 artículos con grado de recomendación B (es decir, que cumple 3 ó 4 criterios de acuerdo con la medicina basada en la evidencia)

– ANA + 1:40 (25-30%)

V. Recomendaciones Iniciales

1. Cómo informar los resultados.
2. Sustrato – HEp – 2. No se debe informar como positivo o negativo. Se debe informar el título y el patrón de la inmunofluorescencia. Algunos laboratorios informan los títulos de los controles, la especificidad, la sensibilidad y los controles positivos.
3. Indicaciones para su uso en la clínica:
 - a. Existe información válida para todas las enfermedades reumáticas.
 - b. Pero se puede solicitar para el estudio de la hepatitis autoinmune, esclerosis múltiple, púrpura-trombocitopénica autoinmune, enfermedad autoinmune tiroidea y fibromialgia.

VI. Aplicabilidad de la prueba de los anticuerpos antinucleares para una enfermedad prototipo de autoinmunidad como el lupus eritematoso sistémico.

- A. Total artículos en la literatura (67 artículos); se excluyeron 27 (42%) por varias razones (no eran aleatorizados, y la selección de los pacientes no fue consecutiva).
- B. Total de artículos analizados: 38 artículos.
 - 21 artículos con grado de recomendación A, 4 artículos con grado de recomendación B y 14 artículos con grado de recomendación C o D (es decir, los artículos que cumplan 2 criterios de medicina basada en la

evidencia se califican como grado C y aquellos que sólo cumplan un criterio se califican como grado D).

- 14 artículos con grado de recomendación A – el sustrato era hígado (ratón o rata).
- 7 artículos con grado de recomendación A – el sustrato es un grupo de células conocidas como células HEp – 2 (células de carcinoma de esófago) – Controles (donadores de sangre y otras enfermedades autoinmunes).

C. Controles negativos para la especificidad

- 49%——— pacientes con otras enfermedades autoinmunes
- 75%——— enfermedades reumáticas no autoinmunes
- 78%——— controles sanos

D. Sensibilidad, especificidad y razón de probabilidades

- SENSIBILIDAD = 93%
- ESPECIALIDAD = 57%

Razón de probabilidades (RP o LR) +: 2.2

Para el diagnóstico del lupus

Razón de probabilidades (RP o LR) -: 0.1

VII.

- A. Por la alta sensibilidad de los anticuerpos antinucleares para el diagnóstico de LES (todos los pacientes), por lo que el lupus seronegativo no puede existir, excepto que tenga otro anticuerpo que no sea detectado por el sustrato y las evidencias de éstos son pocas.
- B. Baja prevalencia en la población general (40-50 casos por 100.000 habitantes), la mayoría de las personas con ANAS + no tienen lupus (valor predictivo + del 11%)
 1. Si los anticuerpos son negativos (no tienen lupus)
 2. Si los anticuerpos son positivos
 - Contexto de la clínica
 - Probabilidad preprueba y postprueba

3. Si tiene pocos síntomas o signos, probabilidad preprueba baja y la prueba de los ANAS positiva (+) tiene poco significado clínico (pueden ser anticuerpos naturales) no patogénicos.

VIII. Monitoreo – Pronóstico

- A. Pocos datos sugieren una correlación entre los títulos de anticuerpos antinucleares y actividad de la enfermedad en el LES.
- B. Determinaciones seriadas de anticuerpos antinucleares tienen un valor desconocido en pacientes con ANAS positivo (+).
- C. Determinaciones de anticuerpos específicos, ejemplo: anticuerpos anti-ADN, pueden tener utilidad clínica.
- D. Cluster de anticuerpos (es decir, la suma de varios anticuerpos específicos como Sm, U1-RNP, Ro y La que aportarían 2 criterios para el diagnóstico de lupus.

IX. Recomendaciones finales

- A. Las pruebas de anticuerpos antinucleares positivos se asocian a varias enfermedades reumáticas sistémicas y otras enfermedades.
- B. Los anticuerpos antinucleares son de gran ayuda para el diagnóstico del LES y para la esclerosis sistémica progresiva (ESP)
- C. La tasa de falsos positivos limita su utilidad como prueba de tamizaje para enfermedades reumáticas.
- D. Los anticuerpos antinucleares algunas veces pueden ser útil para el diagnóstico del síndrome de Sjögren primario y para la polimiositis / dermatomiositis. Pero también puede ser útil para el monitoreo o pronóstico para aquellos casos de artritis reumatoide juvenil que cursan con uveítis y en aquellos casos de fenómeno de Raynaud primario, cuando inician algunos síntomas que puedan asociarse a una enfermedad de tejido conectivo de tipo autoinmune.^{14, 46}
- E. Los anticuerpos antinucleares tienen un papel crítico entre los criterios diagnósticos del lupus asociado a medicamentos, enfermedad

mixta del tejido conectivo y la hepatitis autoinmune.^{14, 46}

- F. Los anticuerpos antinucleares no tienen utilidad para el monitoreo o pronóstico de la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad tiroide autoinmune, enfermedades infecciosas, púrpura trombocitopénica autoinmune y en la fibromialgia.^{14, 46}

X. Lupus Eritematoso Inducido por Medicamentos (LEIM)

A. DIAGNÓSTICO

1. Algunos medicamentos son conocidos y están asociados con ANAS positivo (+) y un síndrome parecido al lupus (lupus-like syndrome).
2. No existen criterios diagnósticos estandarizados para el LEIM.
3. Todos los estudios del LEIM utilizan la presencia de ANAS positivo (+) para la definición del síndrome.
4. Por ello es imposible determinar la sensibilidad y la especificidad de los ANAS en los casos LEIM.
5. Muchos de los pacientes con LEIM desarrollan ANAS positivos (+).
6. El significado pronóstico de estos hechos no es claro
7. Analizar la historia de la exposición y el desarrollo de los síntomas de los pacientes con LES.
8. Analizar y determinar si algunos de los medicamentos que se resumen a continuación se han utilizado en forma reciente (hidralazina, procainamida, isoniazida, clorpromazina, quinidina, metildopa, minociclina, cualquier anticonvulsivante, prazosin, acetabulol, propiltiouracilo).

- B. RECOMENDACIONES. La sugerencia es realizar las pruebas de ANAS en aquellos pacientes que utilizan los medicamentos antes señalados y tengan síntomas de LES.

- C. MONITOREO – PRONÓSTICO: No existen datos disponibles que soporten la utilización

de los ANAS para el monitoreo o pronóstico de los casos de LEIM.

Anticuerpos Antinucleares (ANAS)

Los ANAS, anticuerpos dirigidos contra autoantígenos localizados en el núcleo celular, pueden clasificarse de acuerdo con la estructura reconocida, en anticuerpos dirigidos contra nucleosomas (anti-DNA, antihistonas, anti-DNP o complejo DNA-histona), proteínas no histonas asociadas al ADN (anticentrómero, anti-Sc170, anti Ku, antiláminas nucleares, anti-HMG, anti-PCNA y otros), proteínas no histonas asociadas al ARN (anti-Sm, anti-U1 RNP, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anti-Jo-1 y otros anti-ENA) y nucleolos (antinucleolares). Ese grupo de proteínas no histonas asociadas al ARN que pueden solubilizarse y extraerse de los tejidos con soluciones salinas de baja fuerza iónica, son los llamados ENAS.⁴⁷

Algunos resultados dan excelente valor diagnóstico a los ANAS realizados por IFI, alcanzando hasta el 100% de sensibilidad en pacientes con LES.⁴⁸ Los autoanticuerpos más característicos del LES son los que reaccionan con los componentes del núcleo celular, por lo que las pruebas de tamizaje más sensibles para el LES son los ANAS por IFI, los cuales permiten la detección de anticuerpos aproximadamente frente a 100 especificidades en el núcleo. No obstante la mayor sensibilidad de la IFI es sobre líneas epiteliales (por ejemplo, la Hep-2) para la detección de los ANAS, demostrándose una sensibilidad mayor de este método sobre cortes de criostato de hígado de roedor, otra de las técnicas utilizadas para la detección de ANAS. Así, el sustrato es uno de los tres parámetros evaluados para la adecuada interpretación de los ANAS.

El otro criterio a tener en cuenta para la interpretación de los resultados son los títulos de los anticuerpos, pues la cantidad de éstos (y su especificidad) tienen valor significativo en la interpretación⁴⁹⁻⁵¹. Generalmente, los ANAS son negativos o muy bajos en personas jóvenes y sanas^{49, 52}. Se encuentran elevados en pacientes con enfermedades sistémicas del tejido conectivo⁵⁰⁻⁵¹ y existen en títulos intermedios en algunos pacientes con enfermedades del tejido conectivo como también en personas con una amplia variedad de condiciones: ancianos, embarazo, otras enfermedades autoinmunes (cirrosis biliar primaria, tiroiditis autoinmune)⁵³⁻⁵⁴ dro-

gas (procainamida, hidralazina)⁵⁵⁻⁵⁷, infecciones crónicas^{53, 58} neoplasias^{53, 58} y en personas sanas^{49-50, 52, 59}.

Según la prevalencia de ANAS en la población sana, títulos de 1:80 o menos no son de valor diagnóstico a causa de la alta prevalencia de ANAS positivos hasta estos títulos en la población general. Un punto de corte razonable es alrededor de 1:160 a 1:320. Estos títulos o mayores ayudan a confirmar el diagnóstico clínico de una enfermedad del colágeno. Existen, sin embargo, personas sanas con títulos mayores de 1:320. Entonces el diagnóstico de una enfermedad del tejido conectivo no debe ser hecho solamente por los títulos de ANAS⁶⁰.

El tercer parámetro a analizar en la interpretación de los ANAS es el patrón de los anticuerpos, el cual está asociado con algunas enfermedades y que en los sitios donde no se encuentra disposición de otros parámetros inmunodiagnósticos, nos puede sugerir la patología causante del desequilibrio⁶⁰.

Estos patrones fueron analizados ampliamente en la pasada revisión de historia de los anticuerpos antinucleares⁶¹ (42 REVISTA DE LA ASOCIACIÓN) y ahora comentamos los más característicos. El patrón periférico junto con el homogéneo se relaciona con LES^{53, 58, 62}, el nucleolar con enfermedad mixta y LES^{53, 62-63}, el centrómero con CREST^{53, 63} y moteado con enfermedad mixta del tejido conectivo, LES, esclerodermia y Síndrome de Sjögren^{53, 62}.

Anticuerpos anti-DNA

Existen tres subgrupos:

1. Anticuerpos anti-DNA de doble cadena o bicatenarios sin reacción cruzada con el DNA monocatenario, que reconocen epítopes conformacionales en la doble hélice del DNA. Raros en pacientes con LES.
2. Anticuerpos anti-DNA de doble cadena con reacción cruzada con el DNA de cadena sencilla o anticuerpos anti-DNA nativo, dirigidos contra los grupos fosfatosoxirribosa. Presentes en pacientes con LES.
3. Anticuerpos anti-DNA de cadena simple sin reacción cruzada con el DNA bicatenario, que reacciona con bases, mononucleósidos y mononucleótidos. Inespecíficos, no tienen utilidad diagnóstica⁴⁷.

Para su detección, numerosas técnicas se han utilizado, variando desde la fijación de complemento (1957) a inmunofluorescencia –IFI– (1975) y más recientemente a DNA-microarreglos (2000).¹

Los anticuerpos al DNA son de importancia central en nuestro entendimiento de un mecanismo por el cual los anticuerpos pueden estar relacionados con la patogénesis. En ciertos pacientes, se ha demostrado que el anticuerpo al DNA fue seguido por la aparición de antígeno DNA circulante y la desaparición del anticuerpo por precipitación, sugiriendo la formación de complejos inmunes circulantes⁶⁴. Estudios al respecto, comparando niveles de anti-DNA con síntomas clínicos, han mostrado que la disminución de los títulos del anticuerpo correlaciona estrechamente con el empeoramiento de los síntomas⁶⁵.

Hacia finales de la década de los 50 y comienzos de los 60, la investigación exhaustiva de los mecanismos patogénicos asociados con vasculitis por complejos inmunes y la aplicación de la técnica de IFI, llevó a la realización de anticuerpos anti-DNA en el LES. Dixon y sus asociados (1958-1961) descubrieron paso a paso los eventos patogénicos de la glomerulonefritis y vasculitis en modelos experimentales de la enfermedad del suero. Cuando muestras de pacientes con LES fueron examinadas con la nueva técnica introducida, IFI, depósitos de gammaglobulina fueron encontrados en las asas de capilares glomerulares de riñones enfermos y en los vasos lesionados de otros órganos. Adicionalmente Lachmann (1962) mostró la presencia de C3 junto a depósitos de gammaglobulina; sugiriendo los mecanismos mediados por complejos inmunes importantes en la lesión tisular en el LES⁶⁶.

Sin embargo, es importante no aceptar una relación simplista entre títulos de anticuerpos DNA y actividad de la enfermedad, siendo necesario pensar en términos de mecanismos inmunológicos. Títulos persistentemente altos de anticuerpos no siempre se relacionan con depósitos de complejos inmunes, particularmente si circulan anticuerpos en ausencia de antígeno. Bajos títulos de anticuerpos al DNA pueden ser de gran significancia si son debidos a la remoción de anticuerpos por formación de complejos antígeno-anticuerpo y no como resultado de disminución en la producción.

La importancia de anticuerpos al DNA nativo, en el sero-diagnóstico del LES y en el seguimiento de la res-

puesta al tratamiento impulsó la búsqueda de pruebas más sencillas y sensibles. Wold (1968) desarrolló un inmunoensayo usando DNA *B. subtilis* y precipitación con sulfato de amonio del DNA unido al anticuerpo. Posteriormente perfeccionada por Pincus (1969), Carr (1969), usando antígenos radiotitulados tipo *actinomycin*. Giensberg y Keiser (1973) desarrollaron un ensayo con filtro para separar DNA unido al anticuerpo del DNA libre. Diferentes métodos han avocado el uso de columnas absorbentes para separar cadenas dobles de sencillas del DNA (Tan y Natali, 1970, Winfield y Davis, 1974). Aarden (1975) usó el cinetoplasto de *Crithidia lucilliae* como el origen del DNA nativo en un ensayo de inmunofluorescencia. Éste parece tener ganada amplia aceptación a causa de su relativa facilidad, pero algunas preguntas permanecen respecto a su sensibilidad frente al radioinmunoensayo y si el cinetoplasto contiene únicamente DNA nativo sin asociación con proteínas nucleares⁶⁶.

Al aplicar una técnica para identificar anticuerpos contra el DNA de doble cadena, se debe tener en cuenta que se puede encontrar contaminado con DNA de cadena sencilla que ha sido degradado de DNA de doble cadena en los paquetes que se encuentran en el comercio como en las pruebas de ELISA; así como la contaminación del suero evaluado por DNA de células moribundas, pudiendo encontrarse en éste complejos anti DNA-DNA. Al utilizar pruebas de inmunofluorescencia con *Crithidia lucilliae*, técnica más específica pero menos sensible, se evita lo anterior. El organismo *Crithidia* contiene un kinetoplasto compuesto de DNA puro doble, un destino conveniente para anticuerpos anti-DNA cuando los organismos son fijados al microscopio. Las ventajas del ELISA son la habilidad para cuantificar la cantidad de anticuerpo anti-DNA y el potencial para procesar grandes números de muestras rápidamente en un módulo automatizado⁶⁷. Se ha encontrado este anticuerpo en el 70% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico y se han observado pequeñas variaciones en sus títulos con respecto a la actividad; y la especificidad observada es del 95%⁶⁸.

Entre el 60 y 83% de los pacientes con LES tienen anticuerpos anti-DNA de doble cadena, cuando son evaluados por técnica de Farr, con *crithidia* o ELISA durante algún momento de su enfermedad. La presencia de estos anticuerpos es considerada como uno de los tres desórdenes inmunológicos (los otros desórdenes

inmunológicos son anticuerpos anti-Sm y anticuerpos antifosfolípido), criterios de clasificación usados por el American College of Rheumatology, recordando que un paciente con 4 de estos 11 criterios puede ser clasificado como un paciente con LES con cerca de un 95% de especificidad y un 85% de sensibilidad⁶⁹.

De otra parte, la capacidad de las pruebas para anticuerpos anti-DNA de doble cadena para predecir la exacerbación de la enfermedad continúa siendo controvertida, sugiriendo algunos estudios una fuerte correlación entre incrementos en los niveles de estos anticuerpos y la activación de la enfermedad, aunque para otros es, contrario a este postulado, que los niveles de estos anticuerpos disminuyan notoriamente en la fase aguda de la reactivación, ya que en esta fase de reactivación estos anticuerpos estarían “adheridos” a las diferentes estructuras nucleolares, sitios de unión, disminuyendo la concentración plasmática de estos anticuerpos libres, potencialmente detectables en el laboratorio^{66, 69-71}. Así, la recomendación es que en pacientes con sospecha clínica de actividad de la enfermedad, se solicite anti-DNA para correlacionar los títulos, a pesar de un LR positivo bajo^{70, 72}.

En general, cuando estas pruebas para anti-DNA de doble cadena son realizadas con intervalos regulares, independiente de los síntomas, el aumento de los títulos sugiere que el riesgo de exacerbación de la enfermedad está aumentado por un factor de aproximadamente 2 a 3 en los subsecuentes 3 a 4 meses, mientras que un aumento abrupto es usualmente seguido de exacerbación en unas pocas semanas⁶⁹. Exacerbaciones de glomerulonefritis, vasculitis, o ambas, son las manifestaciones clínicas más frecuentes de estas elevaciones de títulos anti-DNA de doble cadena.

Los anticuerpos anti-DNA son muy útiles en el diagnóstico de LES, particularmente en aquellos pacientes con presentación clínica que sugiere una probabilidad preprueba razonable para el diagnóstico de LES. No todos los pacientes con LES tienen un anticuerpo anti-DNA positivo; así un anti-DNA negativo no excluye el diagnóstico de LES, aunque es poco probable. Los anticuerpos anti-DNA no son útiles para el diagnóstico de otras enfermedades reumatológicas. En general, el anticuerpo anti-DNA debe ser reservado a pacientes con ANAS positivos⁷⁰.

Los anti-DNA de cadena sencilla tienen un valor diagnóstico muy bajo⁷⁰. Se han detectado en el suero de pacientes con varias formas de LES así como otras enfermedades, incluyendo dermatomiositis⁷³, morfea⁷⁴ y síndrome de Sjögren⁷⁵. Son especialmente prevalentes en morfea lineal en niños⁷⁶.

Anticuerpos anti-Histona

Los anticuerpos anti-Histona (AaH) se dirigen frente a los componentes proteicos de los nucleosomas, los complejos DNA-proteínas, que forman la estructura de la cromatina, transcripcionalmente inactiva. Se encuentran en el núcleo, en una estructura altamente organizada consistente en 3 subunidades, dos dímeros H2A-H2B los cuales rodean un tetrámero H3-H4 y con este complejo proteico entero rodean la tercera subunidad la cual comprende aproximadamente 2 giros de DNA⁷⁷⁻⁷⁸. Cada nucleosoma está unido por un conector de longitud variable el cual está asociado con histona H1.

Los anticuerpos a todas las clases de histonas de mamíferos están presentes en LES, pero no están restringidas a esta enfermedad, ya que también han sido detectados en autoinmunidad inducida por drogas, artritis reumatoide⁷⁹⁻⁸⁰ y enfermedad del tejido conectivo no diferenciado⁸¹. Tiene interés histórico y clásico por su responsabilidad en la generación de células LE.

Sus primeras determinaciones fueron por técnica de fijación de complemento (Kunkel, 1960). Un método de IFI fue introducido por el Dr. Tan en 1976, basado en el principio que las histonas son extractables del tejido con ácido clorhídrico diluido (0.1 normal) sin cadenas de DNA.

El inmunoensayo de fase sólida también ha sido utilizado para detección de anticuerpos anti-histona (AaH). La unión de histonas o subfracciones de ésta a superficies de poliestireno junto a la unión de anticuerpos con isótopos marcados es detectada.

Significancia clínica de AaH:

Los AaH son encontrados en tres enfermedades reumáticas sistémicas, lupus inducido por drogas en aproximadamente 90% de los pacientes⁸²⁻⁸³, LES en 30%⁵⁰ de los casos pero generalmente asociado a otros anticuerpos^{50, 84-85}, y AR. Otras enfermedades en las que se ha observado la presencia de AaH aunque con menor

frecuencia incluyen la cirrosis biliar primaria, la hepatitis autoinmune, la esclerodermia, infección por virus de Epstein-Barr, la enfermedad de Chagas, la esquizofrenia, la neuropatía sensorial, las gammopatías monoclonales y el cáncer⁸⁶⁻⁸⁷. La alta prevalencia de AaH en lupus inducido por drogas fue observada primero con el ensayo de Inmunofluorescencia (Fritzler y Tan, 1978), y se encontró una asociación con cadenas sencillas de DNA, únicamente.

Los medicamentos más relacionados son la procainamida, hidralazina, y anticonvulsivantes como la difenilhidantoína (Alarcón-Segovia, 1969; Blomgren, 1973; Lee y Chase, 1975; Weinstein, 1980).

Se han encontrado bajos niveles de acetiltransferasa hepática en estos pacientes, enzima capaz de acetilar drogas como hidralazina y procainamida⁶⁶.

Recientemente se ha demostrado que anti-H1 es un marcador sensible (45%) y altamente específico (98%) para el diagnóstico de LES⁸⁸. Adicionalmente el anti-H1 es un marcador altamente específico y sensible para actividad del LES y se sugiere el uso paralelo con anti-DNA de doble cadena para el diagnóstico y monitoreo serológico del LES⁸⁸.

Las **indicaciones** para solicitar estos anticuerpos son, en pacientes con sospecha de LES inducido por drogas. Su presencia apoya ampliamente el diagnóstico. El LES, sin embargo, no puede ser excluido en la presencia de anticuerpos antihistona⁶⁰.

Anticuerpos anti-Sm y RNP

Las características bioquímicas e inmunológicas de los antígenos Sm y RNP nuclear fueron dilucidadas por los estudios importantes de Lerner y Steitz⁸⁹ quienes introdujeron las herramientas de biología molecular dentro de este campo y mostraron que estos auto-antígenos eran partículas subcelulares compuestas de una especie de pequeños complejos nucleares RNAs (U-RNAs) con proteínas. Este grupo de auto-anticuerpos fue ilustrativo en mostrar que el RNP estaba involucrado en el empalme de precursores de RNA-mensajero^{66, 90}.

Aunque la estructura molecular de los antígenos de RNP y Sm reconocidos por los auto-anticuerpos del LES han sido mostrados como complejos de U-RNAs y proteínas, los determinantes antigénicos son las proteínas

y no el componente RNA. Los antígenos de Sm consisten en al menos 4 proteínas, llamadas convencionalmente B' (29 kDa), B (28kDa), D1, D2, D3 (16kDa), E (13kDa), F y G. Los antígenos de RNP son de 70, 33 (A), y 22 (C) kDa⁴⁷.

Los anticuerpos al Sm y al RNP han sido detectados por inmunodifusión radial, la cual tiene alta especificidad y baja sensibilidad (Tan y Kunker, 1966; Mattioli y Reichlin, 1971; Nortway y Tan, 1972), hemaglutinación pasiva (Sharp, 1972; Notman, 1975), contrainmuno-electroforesis (Kurata y Tan, 1976; Bresnihan, 1977), y más recientemente por análisis de precipitados snRNAs (Lerner y Steitz, 1979). La actual ELISA es alta en sensibilidad y baja en especificidad⁶⁶.

Todos los anticuerpos anti-RNP muestran un patrón nuclear granular distinto por IFI, reflejo de la distribución focal de los snRNP de los espliceosomas en el nucleoplasma; las partículas individuales y los epítomos proteínicos pueden ser determinados por inmunoprecipitación o inmunoblot⁴⁷.

Estas partículas incluyen U1, U2, U4/U6, U5, U7, U11 y U12, todas ellas son snRNP, cada una de las cuales consta de su respectivo RNA nuclear pequeño rico en uridinas (U) y un conjunto de polipéptidos, que incluyen un core común de polipéptidos "Sm", así como también polipéptidos específicos de partícula⁹¹.

Significancia clínica:

El Anti-Sm es diagnóstico de LES por inmunodifusión⁹²⁻⁹³, pero está ausente en otras enfermedades reumatológicas. En LES agudo, está presente en 75% de los casos. Su especificidad por LES es muy alta (alrededor del 98%) y su sensibilidad es de solo 20 al 30%. Muchos pacientes con anti-Sm también tienen anti-RNP⁹⁴⁻⁹⁵, no así de la forma inversa⁹⁶⁻⁹⁷.

La interpretación del anti-snRNP es técnico-específica. Las especificidades anti-snRNP U1 componen una porción sustancial de la respuesta inmune en la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC) en la que el 100% de los pacientes por definición presentan únicamente este anticuerpo⁹⁸. Otros anticuerpos anti-snRNP, dirigidos específicamente contra U2, U5 o U7 también se han descrito en el LES⁹¹, pero con una frecuencia baja (30%) y en asociación con otros anticuerpos⁹⁹. También han sido reportados raramente en LES neonatal¹⁰⁰⁻¹⁰¹.

La presencia de RNP está usualmente asociada con esclerodactilia, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, baja incidencia de enfermedad renal, disfunción pulmonar, artritis y miositis^{71, 102-103}.

Las **indicaciones** para solicitar anticuerpos anti-RNP y anti-Sm son cuando se intenta confirmar el diagnóstico de EMTC^{96, 104-106} y LES⁹²⁻⁹⁴ respectivamente.

Anticuerpos a SS-A/Ro y SS-B/La

Dirigidos contra partículas ribonucleoproteínicas distintas¹⁰⁷. Ro se compone de una proteína de 60 kDa asociada a pequeños RNA conocidos como RNA hY1, hY3, hY4 y hY5¹⁰⁸. La una ribonucleoproteína de 43 kDa a 52 kDa, toma parte en la regulación transcripcional del RNA polimerasa III así como también de algunos RNA mensajeros (RNAm)¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

Los auto-anticuerpos a partículas subcelulares a SS-A/Ro y SS-B/La son encontradas en Síndrome de Sjögren (SS) y LES. El antígeno Ro fue aislado por primera vez de extracto de bazo humano y fue identificado en una precipitación por inmunodifusión con anticuerpos de pacientes con LES¹¹¹. Este estudio fue extendido y el antígeno La fue también identificado en extracto de bazo humano con suero de LES¹¹².

En adición al LES y (SS) el Ro está presente en alta frecuencia en un subgrupo clínico de LES llamado Lupus Cutáneo subagudo¹¹³⁻¹¹⁴. Muchos de estos pacientes han sido falsamente titulados ANAS negativos. Adicionalmente el antígeno Ro parece variar en cantidad en célula de diferentes especies¹¹⁵ así, que, si el sustrato usado para IF tenía un bajo contenido del antígeno, el ANA podría ser interpretado como negativo. El anti-Ro también está altamente asociado con el Lupus neonatal, una forma de Lupus en la cual está relacionado la transferencia transplacentaria de auto-anticuerpos IgG de la madre al niño y manifestado en éste como un rash cutáneo y bloqueo cardíaco congénito¹¹⁶⁻¹¹⁷.

El antiSS-B/La está frecuentemente asociado con antiSS-A/Ro, más no viceversa.

Significancia clínica:

Provost y colaboradores reportaron en 1977, que pacientes con LES con anti-Ro tenían una prevalencia aumentada de fotosensibilidad, especialmente en el subtipo cutáneo subagudo (LECSA), enfermedad renal,

(SS) y presencia de factor reumatoide, y que 75% de estos pacientes tenían un antiSS-B/La positivo⁶⁶. Además tiene asociación con exantema fotosensible, enfermedad pulmonar, linfopenia y menos con trombocitopenia y deficiencias del complemento^{71, 118}. Puede estar asociado con una alta incidencia de vasculitis¹¹⁹⁻¹²² y asociación con HLA-DR3¹²³, -DQ2¹²⁰ y DRw52^{119, 124}.

Aunque lo más frecuente es que se asocien con el SS, aproximadamente el 40% de los pacientes con LES tienen actividad anti-Ro, y entre el 10% y el 15% tienen actividad anti-La. En el LES, anti-La se correlaciona con una aparición tardía del LES, SS secundario, síndrome de lupus neonatal y con los genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II HLA-DR3, -DQ1 y DQ2, así como también cierta protección frente a la nefritis asociada al anti-Ro^{71, 125-127}.

Indicaciones para solicitar anticuerpos anti-Ro y anti-La: diagnóstico de fotosensibilidad, ciertos pacientes con LES, sospecha LECSA, de lupus neonatal, de SS y en la valoración de vasculitis crónica idiopática y en pacientes con LES o LECSA con ANAS negativo (sustrato animal)^{119, 121, 123, 128-132}.

Referencias

1. Rahman A, Hiepe F. Anti-DNA antibodies – overview of assays and clinical correlations. *Lupus* 2002; 11: 770-773.
2. Suárez-Almanzor ME, González-López L, Gámez –Nava JI y cols. Utilization and predictive value of laboratory tests in patients referred to rheumatologists by primary care physicians. *J Rheumatol* 1998; 25: 1980-1985.
3. Ardila E, Sánchez R, Echeverry J. Estrategias de Investigación en medicina clínica. Editorial Manual Moderno, 2002; 135-168.
4. Hayward R, Wilson M, Tunis S, Bass E, Guyatt G. For the evidenced-based medicine working group. Users' guide to the medical literature. VIII. How to use clinical practice guidelines. A. are the recommendations valid? *JAMA* 1995; 274: 570-574.
5. Wilson M, Hayward R, Tunis S, Bass E, Guyatt G. For the evidenced-based medicine working group. Users' guide to the medical literature. VIII. How to use clinical practice guidelines. B. are the recommendations and will they help you in caring for your patients? *JAMA* 1995; 274: 1630-1632.
6. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL. For the evidenced-based medicine working group. Users' guide to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid? *JAMA* 1994; 389: 389-391.
7. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL. For the evidenced-based medicine working group. Users' guide to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results an will they help me in caring for my patients? *JAMA* 1994; 271: 703-707.

8. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL. For the evidenced-based medicine working group. Users' guide to the medical literature. III. How to use and article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid? *JAMA* 1994; 389: 389-391.
9. Van Walraven C, Naylor CD. Do know what inappropriate laboratory utilization is? *JAMA* 1998; 280: 550-558.
10. Sackett DL, Strauss SE, Scott Richardson W, Rosenberg W, Haynes RB. Evidence - based Medicine. Second Edition Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, 2000; 67-95.
11. Black ER, Bordley DR, Tape TG, Panzer RJ. Diagnostic Strategies for common medical problem. Second Edition American College of Physicians 1998; 18-46.
12. American College of Rheumatology Ad hoc Committee on Immunologic testing guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: An introduction. *Arthritis Care Research* 2002; 47: 421-433.
13. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH, and the American College of Rheumatology Ad hoc Committee on Immunologic testing guidelines. *Arthritis Care Research* 2002; 47: 434-444.
14. Hargraves MM. Discovery of the LE cell and its morphology. *Mayo Clin Proc* 1969; 44: 579-599.
15. Emlen W, O'Neill L. Clinical significance of antinuclear antibodies: comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1612-1614.
16. Lock RJ, Unsworth DH. Antibodies to extractable nuclear antigens: has technological drift affected clinical interpretation?. *J Clin Pathol* 2001; 54: 187-190.
17. Swaak AJ, Huysen V, Smeenk RJ. Antinuclear antibodies in routine analysis: the relevance of putative associations. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 110-114.
18. Juby A, Johnston C, Davis P. Specificity, sensitivity and diagnostic predictive value of selected laboratory generated autoantibody profiles in patients with connective tissue disease. *J Rheumatol* 1991; 18: 354-358.
19. Fritzler MJ, Pauls JD, Kinsella TD, Bowen TJ. Antinuclear, anticytoplasmic, and anti-sjögren syndrome antigen A (SS A/Ro) antibodies in female blood donors. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 36: 120-128.
20. Anderson P. Correlation of smooth-muscle and nuclear antibodies in normal subjects. *Exp Immunol* 1977; 27: 74-77.
21. Svec KH, Veit BC. Age-related antinuclear factors: immunologic characteristics and associated clinical aspects. *Arthritis Rheum* 1967; 10: 509-516.
22. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 455-464.
23. Maddison PJ, Skinner RP, Pereira RS, Black CM, Answell BM, Jayson MI, et al. antinuclear antibodies in the relatives and spouses of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 793-799.
24. Barnett Aj, McNeilage LJ. Antinuclear antibodies in patients with scleroderma and in their blood relatives. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 365-368.
25. Harvey G, Black C, Maddison P, McHugh N. Characterization of antinuclear antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and the relatives. *J Rheumatol* 1997; 24: 477-484.
26. Pereira S, Black C, Welsh K, Ansell B, Jayson M, Maddison P, et al. Autoantibodies and immunogenetics in 30 patients with systemic sclerosis and their families. *J Rheumatol* 1987; 14: 760-765.
27. Solheim BG, Larsen RA. Family studies in systemic lupus erythematosus. IV. Presence of antinuclear factors (ANFs) in the total populations of relatives and spouses, and the correlation to rheumatic disease. *Acta Med Scand Suppl* 1972; 543: 43-53.
28. Valentini G, Impronta RD, Resse M, Migliaresi S, Minucci PB, Tirri R, et al. Antinuclear antibodies in first-degree relatives of patients with polymyositis-dermatomyositis: analysis of the relationship with HLA haplotypes. *Br J Rheumatol* 1991; 30: 429-432.
29. Weitzman RJ, Walker SE. Relation of tired peripheral pattern ANA to anti-DNA and disease activity systemic lupus erythematosus. *Ann Rheumatic Dis* 1977; 36: 44-49.
30. Sulcebe G, Morcka K. Diagnostic and prognostic significance of different antinuclear antibodies in more than 1000 consecutive Albanian patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 255-261.
31. Davis P, Stein M, Ley H, Johnston C. Serological profiles in the connective tissue diseases in Zimbabwean patients. *Ann Rheumatol. Dis.* 1989; 48: 73-76.
32. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and the therapeutic criteria committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1989; 23: 581-590.
33. CChudwin DS Ammann AJ, Cowar MJ, Wara DW. Significance of a positive antinuclear antibody test in a pediatric population. *Am Dis Child* 1983; 137: 1103-1106.
34. Calvo-alen J, alarcon GS, Burgard SL, Burst N, Bartolucci AA, Williams HJ. Systemic lupus erythematosus: predictors of its occurrence among a cohort of patients with early undifferentiated connective tissue disease: multivariate analyses and identification of risk factors. *J Rheumatol* 1996; 23: 469-475.
35. Ginsburg WW, Conn DL, Bunch TW, McDuffie FC. Comparison of clinical and serologic markers in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome: a review of 247 patients. *J Rheumatol* 1983;10: 235-241.
36. Arroyase CM, Giambone MJ, Rich KC, Walaszek M. The frequency of antinuclear antibody (ANA) in children by use of mouse kidney (MK) and human epithelial cells (HEp-2) as substrates. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 741-744.
37. Jonsson H, Neved O, Sturfelt G. The effect age on clinical and serological manifestations in unselected patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1988; 15: 505-509.
38. Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, Arnett FC, Bias WB, Provost nTT, et al. Systemic lupus erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine* 1985; 64: 285-295.
39. Arnett FC, Bias WB, McLean RH, Engel M, Duvic M, Goldstein FC, et al. Connective tissue disease in southeast Georgia: a community based study of immunogenetic markers and autoantibodies. *J Rheumatol* 1990; 7: 1029-1035.
40. Schur PH, De angelis D, Jackson JM. Immunological detection of nucleic acids and antibodies to nucleic acids

- and nuclear antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Clin Exp Immunol* 1974;17: 209-218.
41. Koh WH, Fong KY, Boey ML, Feng PH. Systemic lupus erythematosus in 61 Oriental males: a study of clinical and laboratory manifestations. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 339-342.
 42. Mulli J, Cruchaud a. Immunoreactivity to nuclear antigens in systemic lupus erythematosus with or without nephritis, and in other connective tissue diseases, with particular reference to the RNA-protein antigen. *Int. Arch Allergy Immunol* 1977; 53: 279-289.
 43. Chellingworth MC, Salmon M, Scott DL, Bacon PA. The significance of antibodies against nuclear antibody in rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases. *Rheumatol Int* 1984; 4: 23-25.
 44. Rooij DJ, Habets WJ, Stapel S, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ. Clinical significance of antibodies against nuclear antigens as determined by immunoblotting. *Scand J Rheumatol Suppl* 1985; 56: 93-97.
 45. Kallenberg CG, Wouda AA, The TH. Systemic involvement and immunologic findings in patients presenting with Raynaud's phenomenon. *Am J Med* 1980; 69: 675-680.
 46. Clegg DO, Williams HJ, Singer JZ, Steen VD, Schlegel S, Ziminski C. Early undifferentiated connective tissue disease. II. The frequency of circulating antinuclear antibodies in patients with early rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1991; 18: 1340-1343.
 47. Ruddy S, et al. *Texto de Reumatología de Kelly*. Marbán Editores, España, 2003; 161-174.
 48. Kokuina, et al. *Revista Mexicana de Reumatología* 1999; 14: 84-88.
 49. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1601-1611.
 50. Provost TT, Watson R. Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. In: Norris DA, editor. *Immune mechanisms in cutaneous disease*. New York: Marcel Dekker; 1989; 333-357.
 51. Moder KG. Use and interpretation of rheumatologic tests: a guide for clinicians. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 391-396.
 52. Ward MM. Laboratory testing for systemic rheumatic diseases. *Postgrad Med* 1998; 103: 93-100.
 53. Sontheimer RD, McCauliffe DP, Zappi E, Targoff I. Antinuclear antibodies: clinical correlations and biologic significance. *Adv Dermatol* 1991; 7: 3-52.
 54. Vlachoyiannopoulos PG, Tzavara V, Dafni U, Spanos E, Moutsopoulos HM. Clinical features and evolution of antinuclear antibody positive individuals in a rheumatology outpatient clinic. *J Rheumatol* 1998; 25: 886-891.
 55. Monestier M, Kotzin BL. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus syndromes. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 415-436.
 56. Yung RL, Richardson BC. Drug-induced lupus. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 61-86.
 57. Wilson JD. Antinuclear antibodies and cardiovascular drugs. *Drugs* 1980; 19: 292-305.
 58. Fernández-Madrid F, Mattioli M. Antinuclear antibodies (ANA): immunologic and clinical significance. *Semin Arthritis Rheum* 1976; 6: 83-124.
 59. Xavier RM, Yamauchi Y, Nakamura M, Tanigawa Y, Ishikura H, Tsunematsu T, et al. Antinuclear antibodies in healthy aging people: a prospective study. *Mech Ageing Dev* 1995; 78: 145-154.
 60. Mutasim D, Adams B. A practical guide for serologic evaluation of autoimmune connective tissue disease. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 159-174.
 61. Iglesias A, Méndez P, Rojas A, et al. Historia de los anticuerpos antinucleares. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2002; 9: 288-311.
 62. Burnham TK. Antinuclear antibodies: a simplified classification of the nuclear immunofluorescent patterns. *Arch Dermatol* 1978; 114: 1343-1344.
 63. Bernstein RM, Steigerwald JC, Tan EM. Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 48: 43-51.
 64. Tan E, Carr R, Schur P, Kunkel H. DNA and antibody to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1996; 45: 1732-1740.
 65. Swaak A, Aarden L, van Epps L. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 226-223.
 66. Tan E. Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology. *Advances in Immunology* 1989; 44: 93-230.
 67. Brasington R, Kahl L, Ranganathan P, et al. Immunologic rheumatic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S593-601.
 68. Von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of the systemic rheumatic diseases. *Sem Arthr and Rheum* 1995; 24: 323-358.
 69. Hannahs Bevr. Antibodies to DNA. *The New England Journal of Medicine* 1998; 19: 1359-1368.
 70. Kavanaugh A, Solomon D. Guidelines for Immunologic Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: Anti-DNA Antibody Tests. *Arthritis Care and Research* 2002; 47: 546-555.
 71. Lane SK. Clinical utility of common serum rheumatologic test. *Am Fam Physician* 2002; 65: 1073-1080.
 72. Reeves WH, Satoh M, Wang J, Chou CH, Ajmani AK. Systemic lupus erythematosus. Antibodies to DNA, DNA-binding proteins, and histones. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 1-28.
 73. Buskila D, Berezin M, Gur H, Lin HC, Alosachie I, Terrberry JW, et al. Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. *J Autoimmun* 1995; 8: 415-424.
 74. Falanga V, Medsger TA, Reichlin M. Antinuclear and anti-single-stranded DNA antibodies in morphea and generalized morphea. *Arch Dermatol* 1987; 123: 350-353.
 75. Gripenberg M, Helve T, Kurki P. Profiles of antibodies to histones, DNA and IgG in patients with systemic rheumatic diseases determined by ELISA. *J Rheumatol* 1985;12: 934-939.
 76. Falanga V, Medsger TA, Reichlin M. High titers of antibodies to single-stranded DNA in linear scleroderma. *Arch Dermatol* 1985; 121: 345-347.
 77. Burlingame R, Lowe W, Wang B. Crystallographic studies of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 angstroms. *Science* 1985; 228: 546-553.
 78. Klug A, Finch J, Richmond T. Crystallographic structure of the octamer histone core of the nucleosome. *Science* 1985; 229: 1109-1110.

79. Aitcheson C, Peebles C, Joslin F, Tan E. Characteristics of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 528-538.
80. Rekvig O, Hannestad K. Human antibodies that react with both cell nuclei and plasma membranes display specificity for the octamer of histones H2A, H2B, H3 and H4 in high salt. *J Exp Med* 1980; 152: 1720-1723.
81. Molden D, Klipple G, Peebles C, Rubin R, Nakamura M, Tan E. IgM anti-histone H3 antibodies associated with undifferentiated rheumatic disease syndromes. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 39-46.
82. Fritzler MJ, Tan EM. Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1978; 62: 560-567.
83. Weinstein A. Drug-induced systemic lupus erythematosus. *Prog Clin Immunol* 1980; 4: 1-21.
84. Fishbein E, Alarcon-Segovia D, Vega JM. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1979; 36: 145-150.
85. Aitkaci A, Monier JC, Mamelle N. Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-histone antibodies and their presence in systemic lupus erythematosus sera. *J Immunol Methods* 1981; 44: 311-322.
86. Chen M, Shirai M, Czaja A, et al. Characterization of anti-histone antibodies in patients with type I autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 483.
87. Viard J, Choquette D, Chabre H, et al. Anti-histone reactivity in systemic lupus erythematosus sera: A disease activity index linked to the presence of DNA: anti DNA immune complexes. *Autoimmunity* 1992; 12: 61.
88. Schett G, Smolen J, Zimmermann C, et al. The autoimmune response to chromatin antigens in systemic lupus erythematosus: autoantibodies against histone H1 are a highly specific marker for SLE associated with increased disease activity. *Lupus* 2002; 11: 704-715.
89. Lerner M, Steitz J. 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.
90. Yang V, Lerner M, Steitz A, Flint J. A small nuclear ribonucleoprotein required for splicing of adenoviral early RNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 1371-1375.
91. Peng S, Craft J. Spliceosomal snRNPs autoantibodies. In Peter JB, Shoenfeld Y (eds): *Autoantibodies*. Amsterdam, Elsevier, 1966; 774.
92. Field M, Williams DG, Charles P, Maini RN. Specificity of anti-Sm antibodies by ELISA for systemic lupus erythematosus: increased sensitivity of detection using purified peptide antigens. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 820-825.
93. Beaufils M, Kouki F, Mignon F, Camus J-P, Morel-Maroger L, Richet G. Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1983; 74: 201-205.
94. Ter Borg EJ, Groen H, Horst G, Limburg PC, Wouda AA, Kallenberg CGM. Clinical associations of antiribonucleoprotein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 20: 164-173.
95. Swaak AJG, Huysen V, Smeenk RJT. Antinuclear antibodies in routine analysis: the relevance of putative clinical associations. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 110-114.
96. 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: 149-159.
97. Riboldi P, Asero R, Origgi L, Crespi S, Meroni PL, Sguotti C, et al. Antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1985; 3: 205-211.
98. Burdt M, Hoffman R, Deutscher S, et al. Long-term outcome in mixed connective tissue disease: Longitudinal clinical and serologic findings. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 889.
99. Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 311-335.
100. Provost TT, Watson R, Gaither KK, Harley JB. The neonatal lupus erythematosus syndrome. *J Rheumatol* 1987; 14: 199-205.
101. Provost TT, Watson R, Gammon WR, Radowsky M, Harley JB, Reichlin M. The neonatal lupus syndrome associated with U1RNP (nRNP) antibodies. *N Engl J Med* 1987; 316: 1135-1138.
102. Igarashi A, Takehara K, Soma Y, Kikuchi K, Ishibashi Y. Clinical significance of antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Dermatologica* 1990; 180: 136-140.
103. Tanimoto K. MCTD (mixed connective tissue disease). *Nippon Rinsho* 1994; 52: 2120-2122.
104. Combe B, Rucheton M, Graafland H, Lussiez V, Brunel C, Sany J. Clinical significance of anti-RNP and anti-Sm autoantibodies as determined by immunoblotting and immunoprecipitation in sera from patients with connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol* 1989; 75: 18-24.
105. Lundberg I, Hedfors E. Clinical course of patients with anti-RNP antibodies: a prospective study of 32 patients. *J Rheumatol* 1991; 18: 1511-1519.
106. Knights SE, Leandro MJ, Khamashta MA, Hughes GRV. Minocycline-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 587-590.
107. Peng S, Hardin A, Craft J. Antinuclear antibodies. In Kelly WN, Harris E, Rudy S, Sledge C (eds). *Textbook of Rheumatology*, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1997; 250.
108. Campos-Almaraz M, Barbosa-Cisneros O, Herrera-Esparza R. Ro60 ribonucleoprotein inhibits transcription by T3 RNA polymerase in vitro. *Rev Rhum* 1999; 66: 310.
109. Fan H, Goodier J, Chamberlain J, et al. 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Mol Cell Bio* 1998; 18: 3201.
110. Pannone B, Xue D, Wolin S. A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: Evidenced that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *EMBO J* 1998; 17: 442.
111. Clark G, Richlin M and Tomasi T. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1969; 102: 117-124.
112. Mattioli M and Reichlin M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1974; 17: 421-429.
113. Sontheimer R, Thomas J and Gillian J. Subacute cutaneous lupus erythematosus subset. *Arch Dermatol* 1979; 115: 1409-1415.
114. Sontheimer R, Maddison and Reichlin M. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1982; 97: 664-671.

115. Harmon C, Deng J, Peebles C and Tan E. The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen – antibody system. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 166-173.
116. Franco H, Weston W, et al. Autoantibodies directed against sicca syndrome antigens in the neonatal lupus syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 67-72.
117. Provost T. Neonatal Lupus. *Arch Dermatol* 1981; 4: 67-72.
118. Martin-Villa J, Martinez-Laso J, Moreno-Pelayo M. Differential contribution of HLA-DR, DQ, and TAP2 alleles to systemic lupus erythematosus susceptibility in Spanish patients: Role of TAP2*01 alleles in Ro autoantibody production. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 214.
119. Simmons-O'Brien E, Chen S, Watson R, Antoni C, Petri M, Hochberg M, et al. One hundred anti-Ro (SS-A) antibody positive patients: a 10-year follow-up. *Medicine* 1995; 74:109-130.
120. Provost TT, Watson R, Simmons-O'Brien E. Significance of the anti-Ro(SS-A) antibody in evaluation of patients with cutaneous manifestations of a connective tissue disease. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35: 147-169.
121. Provost TT, Talal N, Harley JB, Reichlin M, Alexander E. The relationship between anti-Ro (SS-A) antibody-positive Sjögren's syndrome and anti-Ro (SS-A) antibody-positive lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1988; 124: 63-71.
122. 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.
123. Reichlin M, Wasicek CA. Clinical and biologic significance of antibodies to Ro/SSA. *Hum Pathol* 1983; 14: 401-405.
124. Alexander EL, McNicholl J, Watson RM, Bias W, Reichlin M, Provost TT. The immunogenetic relationship between anti-Ro(SS-A)/La(SS-B) antibody positive Sjögren's/lupus erythematosus overlap syndrome and the neonatal lupus syndrome. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 751-756.
125. St Clair EW. Anti-La antibodies. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 359.
126. Brucato A, Buyon J, et al. Fourth international workshop on neonatal lupus syndromes and the Ro/SSA-La/SSB System. *Clin Exp Rheum* 1999; 17: 130.
127. Harley J, Scofield R, Reichlin M. Anti-Ro in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 337.
128. Ben-Chetrit E. Anti Ro/La antibodies and their clinical association. *Isr J Med Sci* 1997; 33: 251-253.
129. St Clair EW. Anti-La antibodies. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:359-376.
130. Sontheimer RD, Maddison PJ, Reichlin M, Jordon RE, Stastny P. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1982;97:664-671.
131. Dore N, Synkowski D, Provost TT. Antinuclear antibody determinations in Ro(SSA)-positive, antinuclear antibody-negative lupus and Sjögren's syndrome patients. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8: 611-615.
132. Maddison PJ. Anti-Ro antibodies and neonatal lupus. *Clin Rheumatol* 1990; 9: 116-122.