

Historia de los anticuerpos antinucleares

Antonio Iglesias Gamarra¹, Paúl Méndez², Adriana Rojas³, Cilia Rojas⁴, Federico Rondón⁵,
Álvaro Sánchez⁶, José Félix Restrepo Suárez⁷

Resumen

Durante la práctica médica en reumatología y en otras áreas de la medicina con frecuencia se busca identificar anticuerpos dirigidos contra algunos componentes antigénicos nucleares. Estos anticuerpos se han relacionado con algunas enfermedades y con el tipo de alteraciones que ellas presentan. Las técnicas empleadas para identificar estos anticuerpos han ido variando y mejorando a medida que se amplía el conocimiento en ellos. Presentamos los aspectos históricos más importantes que se dieron en el desarrollo de las técnicas para identificar estos anticuerpos.

Palabras clave: Historia, Anticuerpos Antinucleares, Enfermedades autoinmunes.

Abstract

During the medical practice in rheumatology and in other medical areas is frequent to look for antibodies against some nuclear antigenic components. These antibodies have been related with some diseases and with some alterations found in it. The technique used to identify these antibodies have been changed and improved along with the better knowledge about it. We present and exhaustive review about the most important historic aspect in

the development of technique to identified this antibodies.

Key words: History, Antinuclear Antibodies, Autoimmune diseases.

La inmunología se inició como una rama de la microbiología y su crecimiento inicial siempre estuvo relacionado con el estudio de las enfermedades infecciosas y la respuesta del cuerpo a estos agentes agresores. Los conceptos de contagio y el origen de la teoría de las enfermedades se le atribuyen a Girolamo Fracastoro, un colaborador de Copérnico en la Universidad de Padua, quien escribió en 1546 que “el contagio es una infección que pasa de uno a los otros”, al parecer también es quien describe la sífilis como originaria de Europa y no de América¹. Así de esta manera la inmunología nace de la microbiología, del concepto de vacuna de Jenner y con una dependencia de la tecnología como fueron los lentes y los microscopios que originan los descubrimientos de los diferentes microorganismos en la segunda mitad del siglo XIX y el impulso de los grandes científicos inmunólogos de finales de este siglo como Pasteur, Koch, Metschnikoff y Ehrlich.

La palabra inmunidad procede del término latino *immunitas* (exención, privilegio), que generalmente se utilizó en el sentido político - jurídico (inmunidad política) hasta la década de 1880-1890. Posteriormente adquirió el carácter biológico que está vigente hoy día¹.

Entre los antecedentes históricos, vale la pena resaltar los estudios de Elie Metchnikoff^{1, 2, 3} de 1882, sobre la fagocitosis; los estudios iniciales de Celsus¹ y, especialmente, de Virchow¹ sobre inflamación, en 1871. Johann Miescher¹ en 1874 descubrió el ADN, los estudios sobre el complemento, inicialmente denominado “alexina”, por Jules Bordet^{1, 2, 4}, la hipersensibilidad por

1 Profesor Titular de Medicina Interna y Reumatología. Facultad de Medicina-Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.
2 Residente IV año de Reumatología. Facultad de Medicina-Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.
3 Residente IV año de Reumatología. Facultad de Medicina-Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.
4 Bacterióloga. Profesora Adscrita. Facultad de Medicina-Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.
5 Profesor Asistente de Medicina Interna y Reumatología. Facultad de Medicina-Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.
6 Profesor Asociado de Medicina Interna y Reumatología. Facultad de Medicina-Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.
7 Profesor Asociado de Medicina Interna y Reumatología. Coordinador Unidad de Reumatología. Facultad de Medicina-Unidad de Reumatología. Universidad Nacional de Colombia.

Robert Koch² en 1890, las precipitinas por Rudolf Kraus^{2,5} en 1897, la teoría de las cadenas laterales y el “horror autotoxico” por Paul Ehrlich^{2,6,7} en 1898, los opsoninas por Almoth E. Wright^{2,8} en 1903, la anafilaxia por Charles R. Richet y Paul J. Portier^{2,9} en 1902; la enfermedad del suero por Clemens P. Von Pirquet y Bela Schick^{2,10} y la alergia por Clement Von Pirquet en 1907^{1,2}, viajan a la unión americana, específicamente a Nueva York, donde organizan el laboratorio de inmunología del Monte Sinaí.

Estos últimos estudios sugieren que a finales del siglo XIX e inicios del siglo XX la inmunología tuvo un auge importante, pues en ellos y durante este período empezó a utilizarse un nuevo glosario, con términos tales como “antígeno”, “anticuerpos”, “aglutininas”, “precipitinas”, “sensibilización” y “opsonización”. Con los nuevos descubrimientos inmunológicos de principios del siglo XX como la anafilaxia, la hipersensibilidad y la serología, para la sífilis por Wasserman, se describen una serie de descubrimientos relacionados con la inmunología; surge la figura de Paul Ehrlich (1854-1915), quien estudiando los mecanismos de la neutralización de las toxinas a través del suero inmune, en 1896 plantea la teoría de las cadenas laterales para explicar la aparición de los anticuerpos en la circulación. Ehrlich consideró que las células capaces de formar anticuerpos poseían en la superficie de la membrana cadenas laterales específicas receptoras para los antígenos, de tal manera que fue él quien esbozó el embrión del concepto de receptor; también propuso que la unión del antígeno a las cadenas laterales provocaba la síntesis de nuevas cadenas laterales, las cuales se liberaban en el suero en forma de anticuerpos. Igualmente expuso que la especificidad de la reacción de antígeno y anticuerpo era la llave para que se abriera la compuerta permitiendo la liberación de anticuerpos, y pensó que esta reacción era de naturaleza química, por lo cual fue criticado por Bordet quien pensaba que la reacción era de tipo coloide y por otros investigadores de la época, como Gruber, Arrhenius y Madsen¹. De todas maneras se considera a Ehrlich como el primer investigador que planteó una hipótesis sobre la existencia de receptores específicos sobre células inmunocompetentes y en haber postulado, a comienzos del siglo XX, la teoría del “horror autotoxico” para explicar la autorreactividad y la autoinmunidad.

Entre 1920 y 1947 ocurrió un “silencio inmunológico”, y sólo a finales de la década de 1940, período de



Figura 1. Malcolm Hargraves, quien describe las células LE en 1948¹¹.

intensa investigación citológica en el área de la hematopoyesis que coincide con el interés de la Clínica Mayo en implementar la técnica de biopsia de la médula ósea y en desarrollar la clínica de lupus por O’Leary, Goeckerman, Madden y Montgomery; este ambiente le permitió a Malcolm Hargraves^{11, 12} (Figura 1), rodeado de interés por el conocimiento del lupus, describir el fenómeno L. E., constituyéndose en la primera evidencia de reactividad antinuclear. Posteriormente, el mismo Hargraves¹¹ describiría el factor sérico (que en el futuro serían los anticuerpos anticélulas) al incubar plasma de un paciente con lupus eritematoso sistémico agudo en un material tomado de la médula ósea de un enfermo sin lupus, a la temperatura corporal y las preparaciones concentradas, logrando observar así no sólo las células L. E., sino también el resto del fenómeno L. E. De esta manera se inició el conocimiento de los anticuerpos antinucleares^{11, 12}.

En 1932, Louis Gross^{13, 14}, patólogo del Monte Sinaí de Nueva York, había observado los cuerpos de hematoxilina a nivel de los tejidos cardiacos en los casos descritos por Libman y Sacks en 1923 y 1924 cuando describieron la endocarditis verrugosa en el mismo centro hospitalario; Ginzler y Fox¹⁵ plantearon el origen nuclear de los cuerpos de hematoxilina en los ganglios linfáticos de los pacientes con lupus. Klemperer y cols,

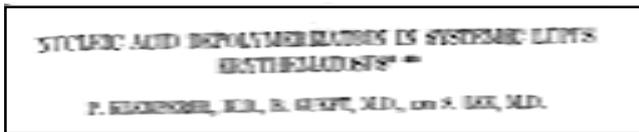


Figura 2. Artículo original de Klemperer y cols Publicado en abril de 1949 donde se demuestra que los cuerpos de hematoxilina estaban compuestos por ácidos desoxirribonucleicos¹⁶.

en 1950 (Figura 2) siendo este investigador jefe del departamento de patología del Monte Sinaí, describen los cuerpos de hematoxilina en diferentes tejidos provenientes de autopsias de pacientes con lupus eritematoso sistémico y plantea la hipótesis que las células L. E. están directamente relacionadas con la enfermedad¹⁶, observación confirmada posteriormente en diversos centros de la unión americana y Europa.

En 1950 John R. Haserick (Figura 3), en la Cleveland Clinic, induce el fenómeno L. E. a nivel experimental al utilizar médula ósea de pacientes no lúpicos con suero de pacientes lúpicos y de esta manera propone que este factor es una globulina. En presencia del factor sérico, o globulina de acuerdo con Haserick y cols^{17, 18, 19, 20}, los núcleos de las células susceptibles sufrían una alteración peculiar y eran posteriormente fagocitados por los polimorfonucleares, al inducir la formación de rosetas con los leucocitos y la formación de células L. E., además el factor L. E. desaparece de la sangre durante la remisión y reaparece durante la recidiva de los pacientes con lupus eritematoso sistémico agudo²⁰. En 1951, 1952 y 1953, Rohn y Bond^{21, 22, 23}, utilizando

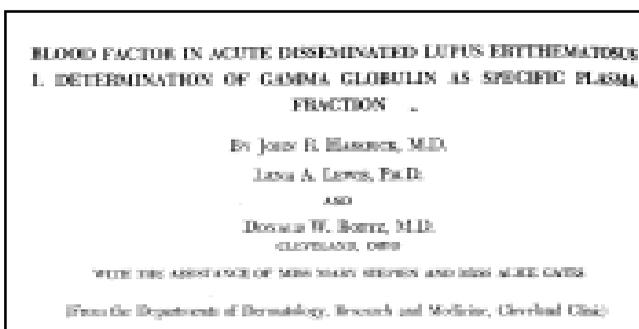


Figura 3. Encabezado del artículo original de John Haserick y cols reportando la presencia de un factor sérico tipo gamaglobulina en lupus²⁰.

coloraciones supravitales, observaron con microscopio de luz que los núcleos de los polimorfonucleares primero se hinchaban y luego se producía la disolución de la cromatina, con una conversión del núcleo a una masa amorfa. Zimmer en compañía de Hargraves reemplaza la médula ósea por el “buffy coat” de sangre periférica para documentar el fenómeno L. E²⁴.

En 1950 y 1951 varios grupos, entre ellos los de Haserick^{17, 20}, Barnes²⁵, Gonyea²⁶, Eppes²⁷ y Lee²⁸, demostraron que el factor sérico estaba en el suero de pacientes con lupus, y tanto Eppes²⁷, Lee²⁸ y Suksta²⁹, con sus equipos de profesionales, como Conley²⁹ demostraron además la presencia del factor en el plasma de los pacientes con lupus. El siguiente paso, con las técnicas inmunológicas disponibles, como la electroforesis de proteínas, la cromatografía por intercambio iónico y la ultracentrifugación, fue el de probar que el factor de las células era una gamaglobulina conocida como IgG. Este hallazgo fue demostrado simultáneamente por varios grupos en el mundo, como los de Haserick^{19, 20}, Conley³⁰, Fallet³¹, Berman³², Willkens³³, Godman^{34, 35}, Larson³⁶ y Lee²⁸. Las propiedades físicas del factor sérico L. E. eran similares a las de las gamaglobulinas normales, como bien lo documenta Hargraves¹¹, Haserick^{19, 20} y Lee²⁸.

Desde 1949 hasta 1951 se demostró que el suero de pacientes con lupus era capaz de inducir:

1. Alteraciones características en las células *in vitro*.
2. Estas alteraciones incluyen aumento de tamaño de algunas células blancas y la aparición de cuerpos que parecen núcleos grandes en el citoplasma de otros polimorfonucleares intactos.

Pero era indispensable averiguar cómo se producían los cambios celulares y morfológicos a través del factor sérico o gamaglobulina. Klemperer, Baehr y Pollack³⁷⁻³⁸ patólogos del Monte Sinaí de Nueva York, en su clásico estudio de patología del lupus, estudiaron ampliamente los cuerpos de hematoxilina en los diferentes tejidos de los pacientes con lupus, y, en 1950, con Gueft³⁹⁻⁴⁰, Lee²⁸, Pollister y Leuchtenberger⁴¹, además de demostrar a través de la reacción de Fulgen que los cuerpos de hematoxilina se encontraban en el núcleo celular, demostraron también que aquello estaba constituido por el ácido desoxirribonucleico.

Estos hallazgos fueron confirmados un año después por Lee, Michael y Vural⁴². Los estudios de Miescher y

Fauconnet⁴³⁻⁴⁵ y de grupos de Cepellini⁴⁶⁻⁴⁷ y Seligmann⁴⁸⁻⁵⁰, a través de las técnicas de absorción y precipitación, y utilizando el factor sérico ya descrito, produjeron una precipitación del ADN humano, de animales y de bacterias, utilizando soluciones muy diluidas (entre 3 y 15 lambdas de ADN por ml) y el suero de los pacientes lúpicos. Produjeron también una reacción específica contra el ADN pero no con el ARN, utilizando varias técnicas como la de Öuchterlony, la hemaglutinación pasiva y la inmunolectroforesis. Además, Holman⁵¹⁻⁵⁴, Seligmann⁴⁸⁻⁵⁰ y Deicher⁵⁵ demostraron las reacciones de precipitación y fijación de complemento con los anticuerpos o los sueros de pacientes lúpicos. Otro de los aportes importantes de Seligmann y Hanau⁵⁶, Hijmans y Schuit⁵⁷⁻⁵⁸ fue la demostración de que el factor sérico era una gamaglobulina, en contraposición de Haserick y sus colaboradores¹⁷⁻²⁰ que pensaban que era una globulina diferente. Posteriormente se analizó el concepto de anticuerpos antinucleares que Halsted Holman⁵⁹, de Stanford University Medical Center, en el libro "Inflammation and Diseases of Connective Tissue" define como "anticuerpos circulantes que reaccionan contra varios constituyentes químicos del núcleo celular". Y que, además, varios de estos anticuerpos antinucleares reaccionan contra el núcleo de las células intactas, contra la desoxirribonucleoproteína, contra el ácido desoxirribonucleico aislado y contra las histonas. En este libro, estas sustancias son consideradas anticuerpos, porque al reaccionar contra los componentes del núcleo, producían reacciones inmunológicas como la fijación del complemento, la hemaglutinación y la precipitación; eran capaces de reaccionar contra los constituyentes celulares de los pacientes de los cuales se obtenían. Además, los anticuerpos antinucleares no tenían especificidad contra órganos o especies ya que podían reaccionar contra constituyentes nucleares de células de diferentes tipos de animales o microorganismos. También en este libro se plantea una discusión en la que participaron Amedeo Bondi⁶⁰ como moderador de la reunión y en la que participaron los investigadores Kaplan, Holman, Angevine, Vaughan, Seegal, Lee, Wagner, Black, Holley y Pollack, sobre los anticuerpos antinucleares, sobre el concepto de hipersensibilidad como un mecanismo para explicar la patogénesis del lupus y sobre el factor reumatoide; también en este libro, estos investigadores empezaron a destacar algunos conceptos sobre la patogénesis del lupus y se comenzó a gestar un conocimiento más adecuado de la enfermedad.

A mediados de la década de 1950, se definía la relación entre el factor sérico (anticuerpos antinucleares) y la célula L. E. y los fenómenos que se presentaban a nivel del núcleo. Rifkind y Gabriel C. Godman⁶¹⁻⁶² de Columbia University, en 1957, utilizando el microscopio de contraste de fase demostraron la secuencia del fenómeno L. E. Sin embargo, la importancia de las células L. E. en el diagnóstico de lupus empezó a perderse cuando Kievits y cols demostraron en 1956 que el 16% de los pacientes con artritis reumatoide las presentaban⁶³. Este artículo creó dudas sobre la especificidad de la reacción para el diagnóstico de lupus. Cinco años después Naomi Rothfield y cols, en 1961, demostraron que las células L. E. no se encuentran en la cuarta parte de los pacientes con lupus, lo que muestra una pobre sensibilidad⁶⁴.

En 1957 Halsted Holman y Henry Kunkel⁵¹ (Figura 4) del Rockefeller Institute for Medical Research de Nueva York demostraron la afinidad del factor sérico al núcleo celular y a la nucleoproteína o al ADN; este reporte es un descubrimiento crucial para el inicio y la utilidad del laboratorio en inmunología para el diagnóstico del lupus. En este artículo, en una nota agregada al final, este par de investigadores señalan que George Friou⁶⁵⁻⁶⁶ de West Haven, Connecticut, ha utilizado la técnica de los anticuerpos fluorescentes y ha obtenido resultados parecidos.

Previamente Deith, Godman y Klemperer⁶⁷ en varios estudios entre 1955 y 1957 demostraron que la

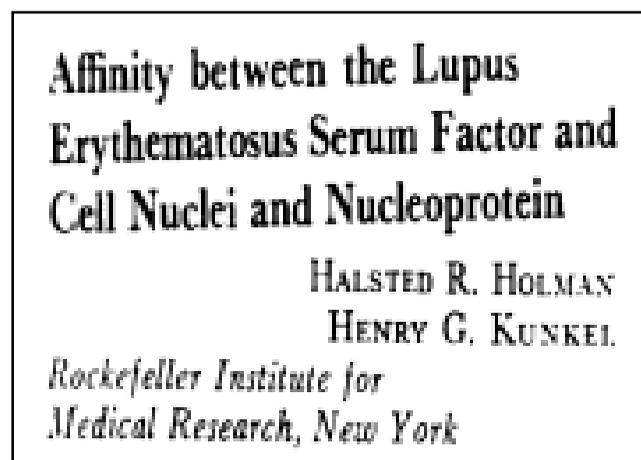


Figura 4. Encabezado del artículo original de Halsted Holman y Henry Kunkel publicado en "Science" en julio de 1957.

gamaglobulina L. E. entra al núcleo e induce los cambios mencionados anteriormente y plantean que la gamaglobulina podría ser inmunológicamente reactiva. Con los estudios de Coons⁶⁸, Godman y Deitch^{34, 35}, Holman y Kunkel^{51, 53-55}, se crearon las bases para el entendimiento de la inmunofluorescencia que George Friou⁶⁹⁻⁷² logró desarrollar, estableciendo una base sólida para el diagnóstico del lupus y de las enfermedades autoinmunes en el laboratorio.

Al describirse el fenómeno L. E. y las nucleoproteínas como blanco de autoanticuerpos específicos, se empezó a dilucidar el papel del ADN como un componente reactivo. En cuatro laboratorios en el mundo y de manera simultánea se informó sobre la presencia de anticuerpos anti-DNA de doble cadena utilizando varias técnicas inmunológicas como la inmunoprecipitación, la fijación del complemento, la hemaglutinación y la doble difusión por el método de Öuchterlony.

Kunkel, Holman y Deicher⁷³, y Stollar⁷⁴ y sus colaboradores, demostraron que además del ADN, las histonas nucleares de los diferentes tejidos (células de riñón o de hígado) podrían servir de blanco para los autoanticuerpos.

George Friou y la Técnica de la Inmunofluorescencia

En la década de 1930 existía mucho interés por el estudio de las proteínas. Simultáneamente se estaba trabajando en la combinación de algunas proteínas séricas; entre otras, la posibilidad de combinar antisueros con colorantes y que los antisueros no perdiesen la propiedad específica de anticuerpos. En 1934 J. Marrack⁷⁵, en la revista "Nature", por primera vez plantea la posibilidad de aplicar esta técnica con un método que no resultó sensible, pero en su libro "La química de los antígenos y los anticuerpos", explica sus estudios de muchos años y a su vez, en forma rudimentaria explica su teoría ("Lattice theory") de la reacción antígeno-anticuerpo, todavía vigente y que contribuyó a sentar las bases científicas sobre este tipo de reacción. Coons, Creech, Jones y Berliner⁷⁶ en 1942 plantearon una solución al concebir que era necesario mejorar la sensibilidad óptica iluminando el espécimen con luz ultravioleta invisible y marcando el anticuerpo con un colorante fluorescente. El colorante se podría detectar más fácilmente, puesto que la luz fluorescente en el tejido no contrastaría con

cualquier luz visible que se transmitiese. Coons⁷⁶ y sus colaboradores demostraron que esto era posible al conjugar el antisuero a la fluoresceína que producía un color amarillo verdoso, que se podía distinguir del azul autofluorescente de los tejidos. Coons⁷⁶ utilizó antígeno de neumococo marcado con fluoresceína. De esta forma se estableció la técnica de la "inmunofluorescencia" que ofrece la posibilidad de observar en el microscopio la localización del antígeno en los tejidos o en los frotis.

En la década de 1940 se inicia la implementación de las tres técnicas:

1. La inmunofluorescencia directa. Desarrollada por Coons^{76, 77} y su equipo en la cual la globulina utilizada se combina con el fluorocromo y el conjugado se aplica directamente al tejido. Este método fue perdiendo importancia por lo siguiente: a) es el menos utilizado; b) el menos seguro; c) el menos sensible; d) es difícil de controlar y e) es necesario realizar la conjugación del suero de los pacientes en forma individual, lo que lo hace demasiado tedioso.
2. La inmunofluorescencia indirecta. Es la que más se utiliza y fue implementada por TH Weller y AH. Coons^{76, 77} en 1954. El tejido que se va a utilizar es tratado con el suero del paciente al que se le une un suero con una antiinmunoglobulina marcada con fluoresceína. Este método es: a) más seguro; b) más versátil; c) fácil de controlar y d) el conjugado que se utiliza es una globulina antihumana que se puede utilizar con el suero de muchos pacientes.
3. En el tercer método de la inmunofluorescencia es utilizado el anticomplemento. Con este método el tejido es tratado con suero inactivado por el calor. Luego se utiliza suero de cobayo; el complemento se agrega al complejo antígeno-anticuerpo en el tejido y puede ser localizado utilizando un antisuero marcado con fluoresceína. Siendo un método indirecto, esta última fase es compleja y difícil. Esta técnica fue desarrollada por Goldwasser y Shepard⁷⁸ en 1959.

El método que se empezó a implementar fue la técnica de la inmunofluorescencia indirecta ya que el tejido en esa época se exponía a una cámara húmeda por un tiempo adecuado para prevenir la evaporación y posteriormente se le unía el anticuerpo. Las proteínas

séricas que no se unían se removían utilizando un buffer de solución salina, después de practicar lavados, el tejido es tratado con inmunoglobulina antihumana. El exceso del conjugado se lava y al tejido se le aplica un buffer de fosfato y glicerol. El espécimen es examinado con ultravioleta y azul-violeta. Los ojos del examinador se protegen con tubos especiales en el microscopio. Así fue el inicio de esta técnica y luego se incorporaron otras variables como: 1) la preparación y el almacenamiento del sustrato tisular; 2) la duración de la coloración y los tiempos de lavado; 3) la especificidad y el título del conjugado y 4) lo más importante, los controles positivos y negativos. Casi en forma simultánea con el desarrollo de las técnicas de la inmunofluorescencia indirecta, se habían realizado varios descubrimientos lo que permitió un mayor desarrollo en el conocimiento del lupus eritematoso⁷². Uno de ellos fue el descubrimiento de la naturaleza en los anticuerpos, en 1939, es decir dos años después de que Tiselius⁷⁹ inventara la electroforesis; este autor junto con Kabat⁸⁰ demostró que los anticuerpos se encontraban contenidos en la fracción de las gamaglobulinas del suero⁷⁹. Cinco años más tarde en 1944, Svedberg y Pedersen⁸¹ en la Universidad de Uppsala introducen un nuevo método físico, la ultracentrifugación, que permitió el estudio de las proteínas séricas con nuevos criterios.

Waldenström⁸² describió la macroglobulinemia que lleva su nombre y se empiezan a fragmentar las nuevas inmunoglobulinas como la IgM y la IgG; Heremans⁸³ en 1958 como resultados de estudios sobre gamaglobulinas anormales presentes en enfermos con mieloma^{83, 84} describe la inmunoglobulina A; así se conocen las gamaglobulinas, no sólo como una proteína, sino como un sistema, al que Heremans denominó el sistema gamma de las proteínas del suero y a partir de 1959 se crea el concepto de inmunoglobulina. Las palabras anticuerpo e inmunoglobulina tienden a fundirse, pero la palabra anticuerpo denota un concepto funcional en tanto que inmunoglobulina más bien denota un concepto estructural y físico-químico. El conocimiento de la heterogeneidad de las inmunoglobulinas se amplió con el descubrimiento de la IgD por Rowe y Fahey^{84, 85} estudiando también el suero de pacientes con mieloma. Posteriormente Ishizaka^{84, 86} describe la IgE al analizar los anticuerpos responsables de las reacciones anafilácticas o anticuerpos reagínicos y por Johansson y Bennich^{84, 87} al estudiar un paciente con mieloma, posteriormente Porter^{84, 88} en 1962 describe un modelo estructural de

inmunoglobulina, conformado por cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos y en 1969 Gerald Edelman^{84, 89} (Figura 5) determinaron la estructura de la secuencia de aminoácidos de una molécula de IgG y por estos hallazgos en 1972 le concedieron a Porter y a Edelman el premio Nobel de Medicina^{84, 90}.

Con los descubrimientos mencionados anteriormente, se facilitan los métodos de precipitación en medio gelificado ideados por Oudin y el profesor Örjan Öuchterlony de la Universidad de Gothenberg en Suecia, quien fue el pionero de la doble difusión en la que se aprecian claramente las líneas de precipitación^{84, 90-91}. Con base en los métodos de precipitación se desarrolla la técnica de inmunoelectroforesis, que Grabar y Burstin^{84, 92} utilizan por primera vez. Casi simultáneamente se establecen las pruebas de antiglobulina por Coombs, Mourant y Race⁹³. El estudio sobre complemento se inicia a comienzos del siglo XX por Ferrata⁸⁴, Ritz⁸⁴ en 1912, Gordon⁸⁴ en 1926, Da Costa y Azevedo⁸⁴ en Brasil en 1932; en la década de 1950, Mayer⁹⁴, Müller – Eberhard⁹⁵ y Lepow⁹⁶ establecen los modernos estudios sobre el complemento. Con todas estas ideas revolucionarias en el campo de la inmunología, Coons⁹⁷ empezó a implementar los métodos de inmunofluorescencia.



Figura 5. Gerald Edelman (primero de izquierda a derecha) en el VIII Congreso Colombiano de Medicina Interna en 1984 donde presentó su conferencia titulada: "La nueva embriología: Las moléculas y los mecanismos que determinan las formas de los embriones". Lo acompañan Jorge Maldonado director de ILADIBA, y Rafael Bermúdez, presidente de este congreso.

La teoría del “horror autotoxicus” planteada por Ehrlich y Morgenroth⁸⁴ en 1899 no tuvo mayor credibilidad, ya que se consideraba que ningún organismo era capaz de producir una reacción inmunitaria frente así mismo. Posteriormente Peter Brian Medawar⁹⁸ empieza a estudiar el concepto de lo propio o como lo describía él, “the uniqueness of the individual”. Se analizan los conceptos de Frank Macfarlane Burnet^{99, 100} sobre los “forbidden clones” (clonos prohibidos), quienes ganan el Premio Nobel de Medicina en 1960 por el descubrimiento de la tolerancia inmunológica adquirida; la dicotomía del sistema inmunitario a través de los estudios de Miller¹⁰¹, Robert Good¹⁰², Globerson y Auerbach citado por Pedro Lain Entralgo⁸⁴ sobre el papel de la médula ósea, el bazo y el descubrimiento de la célula L. E. y el factor sérico (anticuerpos antinucleares), facilitaron la desaparición de ese paradigma según el cual ningún organismo era capaz de reaccionar contra sí mismo, que permaneció hasta la década de 1950. Un concepto tan importante como el de Ehrlich⁷ fue interpretado en forma deficiente o errónea por muchos investigadores que ensombrecieron la mente por muchas décadas sin haber analizado algunos estudios que se habían hecho a comienzos de siglo, en los que se describió la posibilidad de que el cobayo indujera anticuerpos contra sus propios espermatozoides, se conocía la hemoglobinuria paroxística nocturna, la oftalmía simpática, los estudios de Witebsky, Rose y cols¹⁰³ sobre tiroiditis espontánea de tipo experimental y los de Doniach y Roitt¹⁰⁴ sobre tiroiditis espontánea en el humano. Pero en nuestro criterio, una de las ideas más brillantes de Witebsky, fue el planteamiento de que las enfermedades autoinmunes no estaban regidas por los postulados de Koch (relacionados con la etiología de las enfermedades infecciosas), teoría en la que se demuestra el papel de los anticuerpos en la patogénesis de las diferentes enfermedades ocasionando las diferentes lesiones tisulares. Todos estos métodos diagnósticos y estas observaciones inmunológicas permitieron a George Friou^{66, 69-72, 105-107} implementar las técnicas de inmunofluorescencia para el estudio de los anticuerpos antinucleares. En 1957 en la Universidad de Yale, Friou describe la técnica para demostrar los anticuerpos en forma semicuantitativa a través de la microscopía por inmunofluorescencia. Cuatro artículos de este investigador publicados en cuatro diferentes revistas en 1958 permitieron estandarizar el uso de la inmunofluorescencia indirecta para demostrar que en el suero de los pa-

cientes con lupus eritematoso sistémico, existían inmunoglobulinas que se unían al núcleo de las células de los tejidos. Este método sirvió de patrón de oro para la búsqueda de anticuerpos en las enfermedades autoinmunes y como patrón comparativo de otras tecnologías. Un año antes Robbins, Holman, Deicher y Kunkel¹⁰⁸⁻¹¹⁰, describieron los anticuerpos anti-DNA, otro avance importante en el conocimiento del lupus; este grupo fue crucial en el avance del conocimiento relacionado con la estructura de los anticuerpos, la patogénesis del lupus y la implementación de las técnicas para el diagnóstico.

1957-1960

Qué años grandiosos fueron aquellos de 1957 a 1960, ya que en varios laboratorios utilizando la misma técnica se corroboraron los hallazgos de Friou¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ por parte de los grupos de Holborow^{111, 112}, Mellors¹¹³, Alexander^{114, 115}, Calabresi¹¹⁶ y Baugh¹¹⁷. Estos estudios además empezaron a plantear la acción de los anticuerpos a nivel del tejido renal, especialmente en la génesis de la glomerulonefritis, la acción a nivel de los núcleos celulares, la prevalencia de los anticuerpos, los efectos sobre los leucocitos y los primeros estudios de titulación. Así, a finales de la década de 1950 e inicio de la década de 1960, se implementan las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, se establece que los anticuerpos y que el complejo núcleo – histonas constituye un grupo de importantes antígenos nucleares. Con el descubrimiento de la inmunofluorescencia se logró otro avance en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes y se inicia el esclarecimiento de la asociación de los diferentes anticuerpos antinucleares con las diferentes enfermedades, es decir, se empezó a entender el concepto de autoinmunidad y de enfermedad autoinmune.

Patrón de la Inmunofluorescencia

A finales de los años 1950 varios grupos de Europa y Estados Unidos habían dilucidado parcialmente la base inmunológica del fenómeno L. E. y del factor sérico (anticuerpos antinucleares) y documentaban la importancia de la actividad de los anticuerpos antinucleares circulantes y su interacción con los antígenos blanco del núcleo como el ADN y la desoxirribonucleoproteína. Al establecerse y desarrollarse la técnica de la inmunofluorescencia se orientan las investigaciones

para identificar nuevos autoanticuerpos circulantes, caracterizar los respectivos antígenos celulares y demostrar la relación entre autoanticuerpo y nuevos síndromes clínicos.

Las Escuelas de Beck y Rowell (J Swanson Beck y Neville R Rowell (Figura 6))

En el Reino Unido a finales de 1950 y comienzos de la década de 1960 se desarrollan dos escuelas que son muy importantes para el entendimiento de las técnicas de inmunofluorescencia para el diagnóstico de lupus y la comprensión de las manifestaciones dermatológicas del lupus. La escuela del profesor Beck se desarrolla en el departamento de dermatología del Western Infirmary en Glasgow (Escocia) y el extraordinario dermatólogo Neville del General Infirmary en Leeds (Inglaterra). El profesor Beck en conjunción con Neville R Rowell¹¹⁹ describen el paso trasplacentario de los anticuerpos antinucleares en la revista "Lancet" en 1963 y sólo dieciséis años después el pediatra de la Universidad de Uppsala (Suecia), Eva Esscher, pediatra, y JS Scott, obstetra, de Leeds, Gran Bretaña demuestran en 1979 que el paso trasplacentario de estos anticuerpos

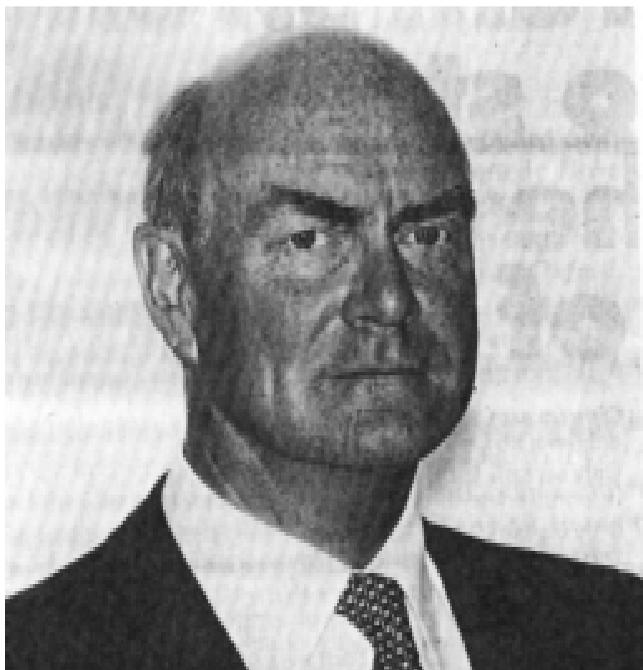


Figura 6. Fotografía de Rowell en el Dowling orator en la que describe la historia natural del lupus eritematoso¹¹⁸.

ocasionaron bloqueo cardiaco en veintisiete niños¹²⁰. Posteriormente describen la caracterización clínica, bioquímica y serológica del lupus discoide al estudiar ciento veinte pacientes, en la que demuestran que en el 5.5% de su serie de casos con lupus discoide pueden evolucionar a lupus eritematoso generalizado¹²¹. En esta misma serie describen cuatro pacientes que conforman un subgrupo caracterizado por eritema multiforme asociado a lupus discoide y la presencia de un anticuerpo de tipo moteado descrito en el laboratorio de Beck en Glasgow y la presencia de factor reumatoide¹²², demuestran que este anticuerpo en los tejidos humanos se precipita en presencia de solución salina, inicialmente se denominó anti-Sjt o anti-SS-B o anti-La. El síndrome de Rowell, como se conoce a la anterior descripción, se considera como la primera descripción de una enfermedad del tejido conjuntivo que se asocia a un patrón inmunológico consistente como es el patrón moteado fino. El profesor Beck, en su laboratorio en Glasgow, desarrolla varias de las técnicas de inmunofluorescencia que se describen a continuación.

Ya establecida la técnica de la inmunofluorescencia, se empezaron a observar diferentes patrones de tinción del núcleo con el suero de los diferentes pacientes, utilizando para ello una técnica bien estandarizada, con sustrato de hígado de ratón. J Swanson Beck y Cols¹²³⁻¹³⁴, de la Universidad de Aberdeen en Escocia analizaron las variaciones morfológicas en el patrón nuclear de los pacientes con lupus, desde el 3 de junio de 1961 hasta agosto de 1967. Este investigador publicó doce artículos en las revistas más importantes de la medicina y de la inmunología de la década de 1960¹¹⁸⁻¹²⁹. Estableció las bases de los diferentes patrones nucleares de la inmunofluorescencia indirecta en el lupus eritematoso, los cuales pueden estar en forma aislada o en combinación.

Dos meses después de la publicación de Beck¹¹⁸; Lachmann y Kunkel¹³⁵, confirmaron el mismo hallazgo, especialmente el patrón homogéneo y el moteado; Fennell, Rodnan y Vásquez¹³⁶ también confirmaron el patrón moteado; igual observación realizaron Bardawil¹³⁷ y sus colaboradores.

Las fuentes antigénicas eran células con núcleos grandes; en esta época se usaron cortes obtenidos por congelación de tejidos de roedores, como el riñón o el hígado de ratón o rata. Después de procesarlos con el suero y marcarlos con un segundo anticuerpo conjuga-

do con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína), se describieron los primeros cuatro patrones de inmunofluorescencia¹¹⁸⁻¹³⁴.

Estos patrones de inmunofluorescencia son los que se observaron y se siguen observando en los pacientes con lupus eritematoso. Otros patrones adicionales se describieron por Burnham y su grupo¹³⁸ en 1966, como el “Speckled-like”. De los patrones de inmunofluorescencia el que produjo más controversias fue el de “Speckled-like” (como moteado), ya que uno de los investigadores, además de Beck, que lo estudió durante muchos años, fue Thomas K Burnham y Cols¹³⁹ del departamento de dermatología del hospital Henry Ford en Detroit quien tituló un artículo en “Seminars in Arthritis and Rheumatism” en noviembre de 1983 como “The True Speckled antinuclear antibody (ANA) pattern: Its tumultuous history”, donde confirma que Beck en 1961 realiza la primera descripción del patrón moteado (the Speckled ANA pattern) en secciones congeladas de hígado de ratas y describe su hallazgo de la siguiente manera: “the nucleus showed numerous minute uniform points of fluorescence scattered throughout its substance. Because the speckles were sparse at the periphery of the nucleus its margins were indistinct”. (Los núcleos muestran numerosos puntitos uniformes y diminutos dispersos a través de la fluorescencia; porque el moteado se encuentra esparcido a nivel de la periferia de los núcleos y sus márgenes son difíciles de distinguir).

En 1966 Burnham y cols¹⁴⁰, utilizando una técnica de inmunofluorescencia, asocian al patrón moteado con la esclerodermia y plantean que este patrón ayudaba a diferenciar a los pacientes con lupus y dermatomiositis de la esclerodermia. Dos años después, en 1968, al estudiar 5.723 sueros el grupo de investigadores dirigidos por Burnham reafirman el significado del patrón moteado para el diagnóstico de la esclerodermia¹⁴¹. Hasta 1979 no existía un acuerdo sobre el significado del patrón moteado. Otro grupo de investigadores conformado por Moroi, Peebles, Fritzler, Kinsella y Garbutt¹⁴²⁻¹⁴⁵, logran describir el patrón anti-centrómero y su asociación con el síndrome de CREST y demostraron que el anticuerpo estaba dirigido contra el quinetocoro de las células en división celular. Estos hallazgos clarificaron un poco los conceptos de Burnham y cols¹⁴⁶ ya que este autor acuñó al término verdadero moteado “true speckles” e insistía en la asociación con la esclerodermia y no lo asociaba al lupus¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

En 1974 al implementar la técnica de impresión en células en bazos humanos, no se asoció al patrón moteado con la enfermedad mixta del tejido conectivo¹⁴⁹,¹⁵⁰ ni con el lupus. Esta enfermedad se describió dos años antes que Burham¹⁴⁹ implementara su técnica por Sharp, Irvin y Tan, quienes la asociaban especialmente a un antígeno nuclear extractable específico que se documentó se asociaba a un patrón moteado, actualmente el anticuerpo está dirigido contra el antígeno U1-ARN^{151, 152}.

Esta discusión persistió desde 1966 hasta la década de 1980, ya que Burham¹⁵³ acuñó otro patrón de inmunofluorescencia descrito como particulado en 1975, en respuesta a un artículo publicado en 1974 por Husain y cols¹⁵⁴, quienes aseguraron que el patrón de la inmunofluorescencia no ayudaba al diagnóstico y que no era específico de una enfermedad determinada. La réplica de Burham a este artículo, la hizo a través de una clasificación de los patrones de inmunofluorescencia y los dividió en dos grupos: no particulado (periférico, homogéneo) y particulado; y a la vez el particulado lo subdividía en el nucleolar (Figura 7) y el verdadero moteado. Esta confusión inicial se fue clarificando a través del tiempo especialmente en los grupos de inmunólogos que formó Henry Kunkel en los diferentes centros de la inmunología y reumatología de la unión americana.

Patrón Nucleolar

Ritchie¹⁵⁵ observa que el patrón homogéneo se forma de una mezcla de dos nuevos patrones como el reticular (es decir, filamentos finos) y el nodular (es decir, como pequeños cuerpos globulares). Esta heterogeneidad de los diferentes patrones se explica por los diferentes autoanticuerpos dirigidos contra los diversos antígenos del núcleo, por la posibilidad que en un mismo paciente existan diferentes autoanticuerpos, por modificaciones en la estructura del núcleo por el trauma o el secado del sustrato o por la presencia de enzimas que causan modificaciones en la estructura del núcleo de tal forma que un solo anticuerpo podría producir varios patrones nucleares a nivel de la inmunofluorescencia.

Significado Inmunológico de los Diferentes Patrones de la Inmunofluorescencia

Mediante esta técnica los autoanticuerpos pueden dar lugar a una tinción nuclear (ANA) o citoplasmática

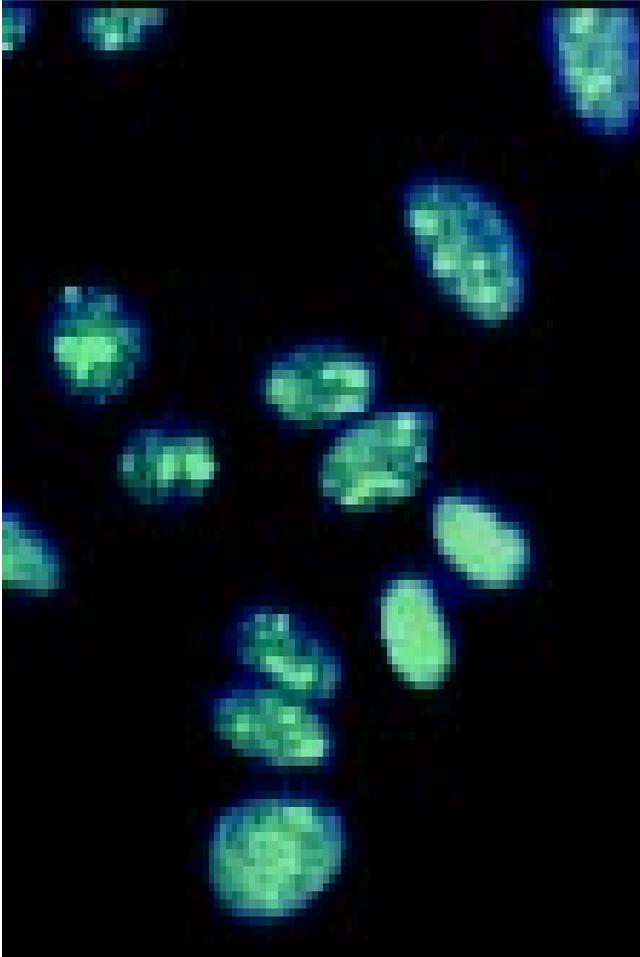


Figura 7. Patrón Nucleolar. Se caracteriza porque los nucléolos se tiñen en forma uniforme.

(ACA). Las variaciones en los patrones de la inmunofluorescencia a nivel de los núcleos celulares muestran que los sueros de los individuos contienen anticuerpos que reaccionan contra los diferentes antígenos que tienen otras localizaciones dentro del núcleo celular, siempre y cuando la sección del espécimen se prepare de la misma manera.

Patrón Homogéneo (Figura 8)

Es el patrón observado con mayor frecuencia en las enfermedades del tejido conectivo pero también el más inespecífico. J. Swanson Beck¹²³⁻¹³⁴ de Escocia fue uno de los primeros investigadores en relacionar este patrón a las nucleoproteínas, complejos ADN – histonas. La diferencia en la publicación de los dos primeros artículos sobre este tema fue sólo de meses, ya que el

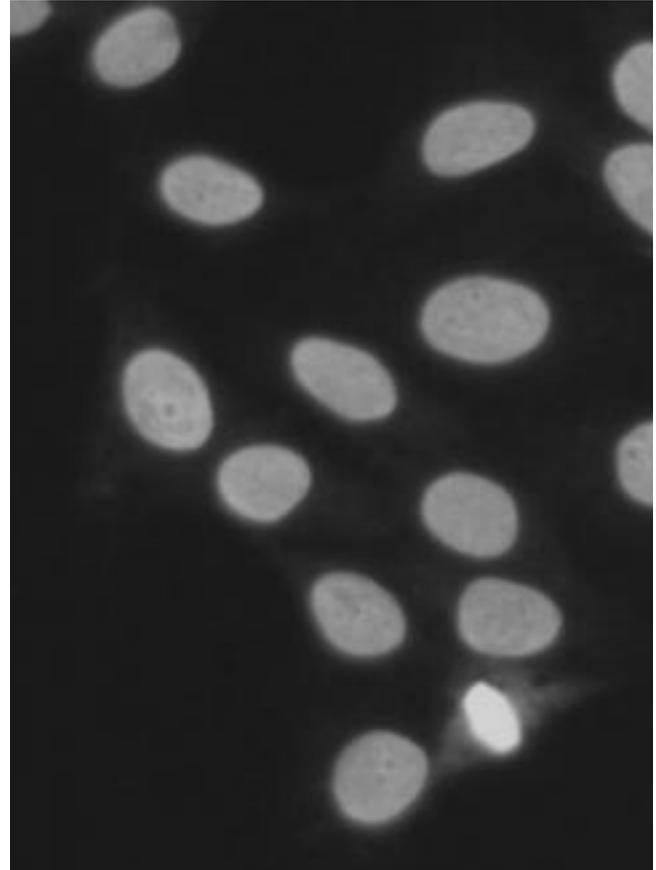


Figura 8. Patrón Homogéneo. El núcleo se tiñe uniformemente y con una intensidad igual.

artículo de Beck se publicó en junio 3 de 1961 y el de Lachmann y Kunkel¹³⁵ en agosto 19 de 1961; ambas se publicaron en “Lancet”. Los dos grupos realizaron otras publicaciones sobre los diferentes patrones, pero Lachmann y Kunkel¹³⁵ fueron los que puntualizaron que el anticuerpo estaba dirigido contra las nucleoproteínas. Pero también, el patrón homogéneo se puede observar cuando hay anticuerpos contra las histonas y en algunos casos de anticuerpos anti-DNA de doble cadena. Se observa especialmente en el lupus, la artritis reumatoide, la esclerodermia, la polimiositis, la dermatomiositis, el síndrome de Sjögren primario y la hepatitis crónica activa.

Patrón Moteado (Figura 9)

Se caracteriza por la presencia de puntos de fluorescencia en toda la extensión del núcleo. Inicialmente se describía que eran anticuerpos dirigidos contra las proteínas nucleares solubles en la solución salina, espe-

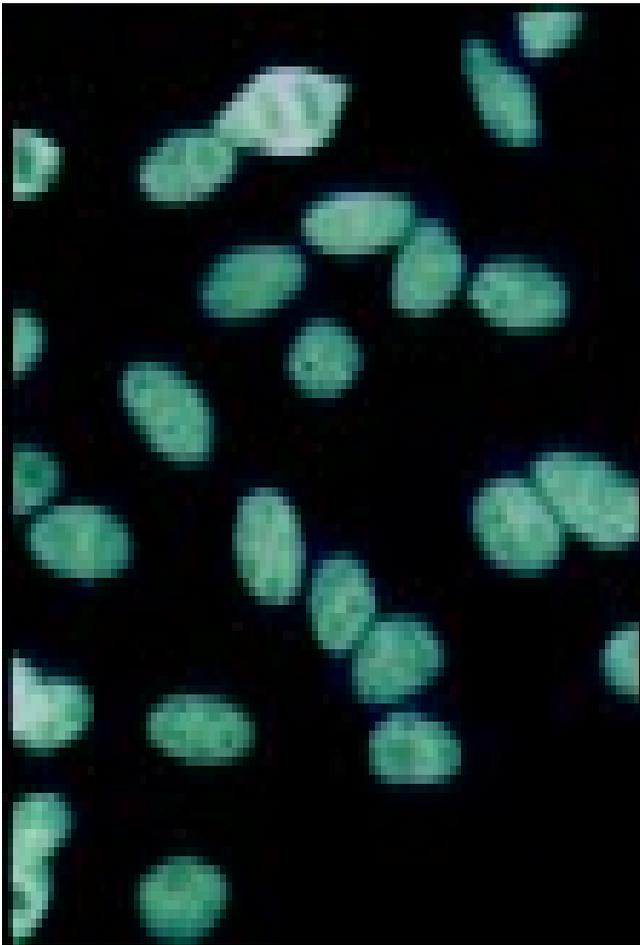


Figura 9. Patrón Moteado. Se caracteriza por la presencia de puntos fluorescentes a través de todo el núcleo, siendo menos numerosos en la periferia.

cialmente por parte de Beck¹²³⁻¹³⁴, Lachmann y Kunkel¹³⁵ y el del grupo de Bonomo, Tursi y Dammacco¹⁵⁶. Posteriormente Beck en 1962 utilizó un buffer de fosfato para identificar el antígeno, pero sólo fue caracterizado por Eng Tan y Henry Kunkel^{157, 158} en 1966.

Cuatro años antes Eng M Tan (Figura 10) se había unido al grupo de Henry Kunkel en Rockefeller University, y estudiaron el suero de Stephanie Smith (Figura 11), una joven paciente con lupus que era pintora. Identificó el antígeno Sm llamado así en honor a la paciente en quien se descubrió, es decir, el primer autoantígeno nuclear no histona caracterizado bioquímicamente y se demostró que este antígeno no era ni ADN ni nucleoproteína y que se encontraba presente en el núcleo de una variedad de tejidos de origen humano y en

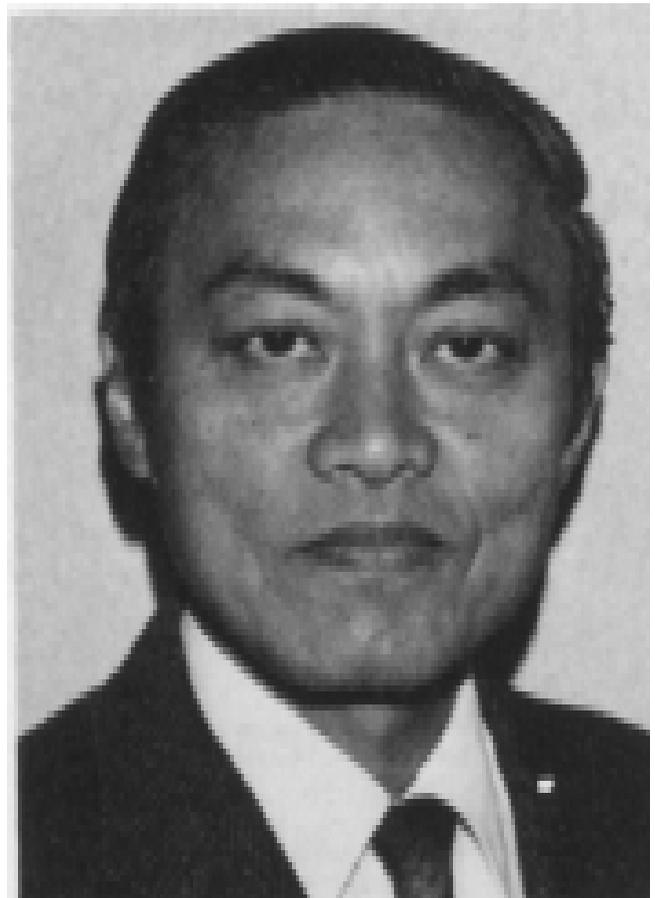


Figura 10. Eng Tan. Describió el anti-Sm en los pacientes con lupus, en 1966.



Figura 11. Pintura de Stephanie Smith, paciente a la cual debe el nombre el anticuerpo anti-Sm.

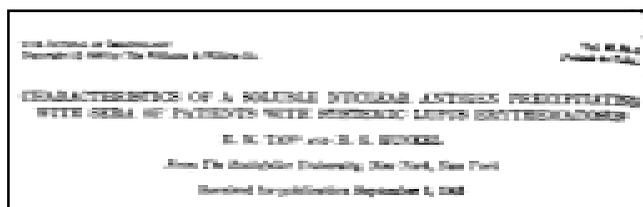


Figura 12. Encabezado del artículo de Tan y Kunkel publicado en el "Journal of Immunology" en 1966.

los bovinos (Figura 12). La caracterización bioquímica de este primer antígeno permitió la apertura para caracterizar una gran variedad de antígenos nucleares y anticuerpos. Se demostró que el antígeno Sm era altamente específico para los pacientes con lupus, observación que ha permanecido con el paso de los años. Posteriormente se fueron describiendo otros autoanticuerpos dirigidos contra antígenos celulares tanto nucleares como citoplasmáticos que se han asociado con el síndrome de Sjögren, la esclerodermia, la enfermedad mixta del tejido conectivo, la dermatomiositis, la polimiositis y el lupus inducido por medicamentos. Estos anticuerpos se encuentran dirigidos contra proteínas nucleares no histonas, conocidas bajo el nombre de ENA (extractable nuclear antigens). Otro anticuerpo se encuentra dirigido contra la proteína asociada al centrómero.

Patrón Periférico (Figura 13)

Casals, Friou y Teugue^{159, 160}, en dos artículos, describieron el patrón periférico al observar una mayor intensidad alrededor de la membrana nuclear y una menor tinción en el centro del núcleo (Figura 13).

En la década de 1980 se analizan los componentes de la membrana nuclear, demostrando que ella está compuesta por una membrana interna y externa, la presencia de unos poros complejos y una laminina nuclear^{161, 162}. Estos poros complejos tienen un diámetro aproximado de 120 nm, los cuales contienen proteínas integrales alrededor del poro como la gp210 y p62. Estos poros permiten el transporte de algunas macromoléculas y la gp 210 participa en el anclaje de la estructura del poro a la membrana nuclear. La membrana nuclear interna contiene proteínas integrales que median la unión de la laminina y la cromatina, algunas de esas proteínas se han identificado tales como el receptor de la laminina B (LBR) y los polipéptidos asociados a la laminina (LAP-1 y LAP-2). La laminina nuclear es una malla de filamentos inter-

medios asociada con la membrana nuclear interna. Se han identificado cuatro diferentes proteínas asociadas a la laminina denominadas A, B1, B2 y C. la secuencia de las laminina A y C son idénticas excepto para su carboxi-terminal, en cambio la laminina B tiene una homología del cincuenta por ciento para la A y la C. durante la interfase de la célula la heterocromatina inactiva durante la transcripción se une a la laminina y esta unión probablemente esta mediada por las proteínas de la laminina y las histonas¹⁶³. Al ocurrir la transcripción la eucromatina se encuentra localizada cerca de los poros nucleares permitiendo que los transcritos del ARN mensajero se expelen hacia los ribosomas (Figura 14).

En 1987 y 1988, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se describe la presencia de anticuerpos dirigidos contra varios componentes antígenicos de la membrana nuclear produciendo un patrón como periférico. Estas descripciones las realizan Reeves y cols en 1987¹⁶⁵ y Wesierska-Gadek¹⁶⁶ y Daguenaix y cols del grupo de Jean-Luc Senecal del



Figura 13. Patrón Periférico.

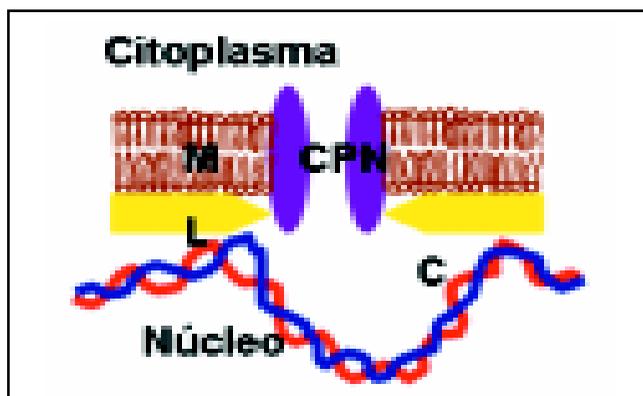


Figura 14. Esquema de la envoltura nuclear. C, Cromatina; L, laminina (que contienen la laminina A, B1, B2 y C; MN, membrana nuclear (en la hoja interna contiene LAP y LBR); CPN, complejo poro nuclear. (Modificado de Nesher, Margalit, Ashkenazi¹⁶⁴)

hospital Notre Dame de la Universidad de Montreal (Canadá) en 1988¹⁶⁷, describiendo anticuerpos contra la laminina B nuclear asociado a lupus eritematoso sistémico, anticuerpos contra la laminina B en pacientes con trombocitopenia, contra la laminina nuclear en hepatitis autoinmune y contra los complejos del poro nuclear respectivamente. Senecal en el grupo de Naomi Rothfield empieza a describir en 1985 la presencia de los anticuerpos contra el citoesqueleto en las enfermedades del tejido conectivo. Posteriormente Senecal viaja a Montreal y describe varios artículos relacionados con la presencia de anticuerpos contra el citoesqueleto, especialmente en 1999 describe la fuerte asociación de los anticuerpos anti-laminina nuclear humana B1 que se asocia al anticoagulante lúcido y algunas manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido^{168, 169}. Al final de la década de los ochenta y especialmente al inicio de los noventa, los antígenos de las membranas nucleares se han logrado identificar, caracterizar y purificar por técnicas inmunológicas, biológicas, químicas y moleculares, así de esta manera se logra demostrar anticuerpos dirigidos contra cinco componentes de la membrana nuclear como el anti-gp210 que se encuentra dirigido contra el antígeno gp210 localizado específicamente en los complejos del poro nuclear, produciendo un patrón periférico punteado en inmunofluorescencia (relacionado a hepatitis autoinmune, artritis reumatoide, polimiositis y síndrome Sjögren's)^{167, 170-176}; anticuerpos anti-p62 dirigidos contra uno de los consti-

tuyentes del poro nuclear (altamente específico para la cirrosis biliar primaria pero con una sensibilidad baja, del 23 al 32%, sin observarse en suero de pacientes con otras enfermedades hepáticas o autoinmunes a excepción del síndrome de Sjögren's primario que se encuentra en el 13% de acuerdo con el estudio de Miyachi y cols)^{177, 178}; anticuerpos anti-LBR, este anticuerpo reacciona contra un epítotope de la laminina B, el significado clínico no es claro, es altamente específico para la cirrosis biliar primaria, pero con una sensibilidad sólo del 1 al 2%^{174, 176, 179}; anti-LAP, se ha observado en varias enfermedades como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren's primario, polimialgia reumática, espondiloartropatías seronegativas, neuritis óptica, síndrome antifosfolípido, hepatitis crónica, síndrome nefrótico, gota y osteoartritis, es decir es muy poco sensible y específico^{177, 179}; anti-laminina, está dirigido contra uno de los componente del complejo, poro nuclear, este anticuerpo tiene una reacción cruzada contra varios componentes de la familia de los filamentos pequeños como la queratina y vicentina¹⁸⁰. El patrón de inmunofluorescencia es periférico, continuo y ancho, especialmente hacia el centro del núcleo que se observa en la mitosis nuclear.

Banda Lúpica

La aplicación y el entendimiento de la banda lúpica la inician los estudios de Vázquez y Dixon¹⁸¹ en 1957 al utilizar el método de la antiglobulina fluorescente para demostrar la presencia de la gamaglobulina a nivel de los riñones y en las lesiones esplénicas del bazo. Dos años después Kaplan y Vaughan^{182, 183} demuestran los depósitos de inmunoglobulinas en la membrana sinovial de los pacientes con artritis reumatoide; en 1961 Wise y cols¹⁸⁴, en varias enfermedades de la piel, demuestran los depósitos de gamaglobulina. Pero la aplicación de la técnica para el estudio de la banda lúpica la realizaron Burham, Neblett y Fine¹⁸⁵ en 1963 en el departamento de dermatología del Hospital Henry Ford en Detroit en la que se demuestran los depósitos de inmunoglobulinas y complemento a nivel de la unión dermo-epidérmica. RH Cormane^{186, 187} en Leyden en marzo de 1964 en la revista "Lancet" describe el depósito de esta inmunoglobulina y complemento en la unión dermo-epidérmica en la piel sana de pacientes con lupus que planteó la posibilidad diagnóstica utilizando esta técnica de la banda lúpica en piel sana para detectar aquellos pacientes con esta posibilidad diagnóstica, esto originó una serie de controversias. Entre la aparición

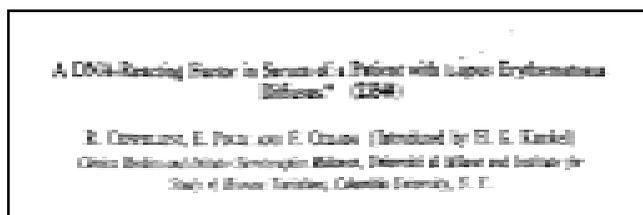


Figura 15. Encabezado del artículo original de Cepellini y sus colaboradores publicado en "PSEBM" en 1957.

del artículo de Burham y Cormane hubo únicamente una diferencia de meses; finalmente el artículo de Eng Tan y de Henry Kunkel Tan¹⁸⁸, que en forma amplia analizan la técnica de inmunofluorescencia para el estudio de la piel de pacientes con lupus y a partir de los artículos antes mencionados se generaliza el estudio de la banda lúpica en los diferentes países del mundo.

Después de la descripción de los anticuerpos contra el ADN, en ese glorioso año de 1957, se demostró por Holborow y cols¹¹¹, Cepellini y cols⁴³ (Figura 15) y por Robbins del grupo de Henry Kunkel¹⁰⁸ que los anticuerpos estaban dirigidos contra el ADN de simple cadena, de doble cadena o ambos. La atención de los investigadores se centró en el estudio y análisis de la clase de anticuerpo, utilizando para ello las técnicas nuevas que se estaban implementando como la cromatografía de celulosa, la centrifugación con gradientes de sucrosa y antiseros marcados con fluoresceína, que lograron demostrar los anticuerpos de la clase IgM, e IgA y las diferentes subclases de la IgG. La naturaleza y estructura ya analizada del ADN, la disponibilidad de los sueros de pacientes con lupus y los trabajos del grupo de Kunkel, en los que participaron Holman, Deicher, Dixon y Koffler¹⁸⁹ sobre su patogenicidad a nivel tisular le permitieron al grupo de David Stollar¹⁹⁰⁻¹⁹⁴ en Boston, Lucien Aarden de Amsterdam, quien describe en conjunción con De Groot y Feltkamp utilizar la *Crithidia lucillae* como sustrato para la determinación de los anticuerpos de doble cadena (anti-dsDNA) utilizando la técnica de inmunofluorescencia¹⁹⁵. Y Roberto Arana en Argentina analiza la naturaleza del ADN y la reactividad de los sueros de los pacientes con lupus¹⁹⁶. Roberto M Arana procedente de Argentina, quien realizó su fellow research con el doctor Seligmann en París. Durante su estancia publica en 1967 un artículo clásico sobre anticuerpos dirigidos contra

el ácido desoxirribonucleico de cadena simple y de doble cadena en los pacientes con lupus eritematoso sistémico¹⁹⁷. En ese mismo año Koffler y cols¹⁸⁹ confirman la presencia del ADN en los pacientes con nefropatía lúpica. Posteriormente Arana regresa a Argentina y fue uno de los pioneros en Suramérica en la implementación de las técnicas de los anticuerpos antinucleares.

Stollar y su grupo¹⁹⁰⁻¹⁹⁴ diseñan varios trabajos para estudiar la naturaleza del ADN y su reactividad con los sueros de los pacientes lúpicos, pero en uno de ellos, con Naomi Rothfield¹⁹⁸, se analiza claramente la clase de inmunoglobulina, el patrón de inmunofluorescencia, la actividad del complemento por los diferentes anticuerpos anti-DNA, que abrió las puertas de la caja de pandora, para entender los conceptos básicos implicados en la patogénesis de la glomerulonefritis, la banda lúpica, los conceptos de daño tisular mediado por anticuerpos y en el consumo del complemento, y finalmente, los claros intentos para comprender lo que estaba ocurriendo en el daño renal. Un año después Tojo y Friou¹⁹⁹ relacionan el concepto de nefropatía, en la cual existía un antígeno fijo (en el glomérulo) y la acción de un anticuerpo específico de tipo IgG. En ese mismo año Peter Schur (Figura 16) y Sandson²⁰⁰ en un artículo clásico publicado en el *New England Journal Medicine*



Figura 16. Peter Schur (cuarto de derecha a izquierda, de pie) y sus colaboradores en el año de 1982 en su laboratorio en Brigham's and Women Hospital en Boston, en esa época trabajaban en la técnica del ADN, especialmente en método de ELISA. Lo acompaña Rafael Valle (en línea intermedia, con anteojos), quien fue el primer latinoamericano en realizar el fellow research en Reumatología e Inmunología en el laboratorio de Peter Schur.

amplían el entendimiento de los factores inmunológicos (anticuerpos y clínica del lupus); con el advenimiento de la biología molecular se empezaron a dilucidar los secretos del misterioso ADN y así se logró establecer que existen anticuerpos que se unen exclusivamente a componentes como las bases purínicas, los nucleósidos, los nucleótidos, los oligonucleótidos, los ribosa-fosfato. En contraposición los anticuerpos que se dirigen al ADN de doble cadena se unen a la ribosa-fosfato, a las bases (desoxiguanosina) o a conformaciones particulares de la doble hélice, algunos de estos anticuerpos reaccionan contra el ADN tipo B, y otros anticuerpos reaccionan preferencialmente al DNA-z²⁰¹⁻²⁰⁴.

Varias técnicas se utilizaron para la demostración de los anticuerpos contra el ADN nativo como la de precipitación por Selligmann²⁰⁵, la de la fijación del complemento por Cepillini y cols⁴⁵ y Robbins y cols¹⁰⁷, la inmunofluorescencia por Friou y cols⁶⁵ y la de inhibición por Haptenos, por Levine y Stollar^{190-194, 206} pero estas técnicas eran limitadas por la actividad anticomplementaria en muchos pacientes con sueros lúpicos y la carencia de sensibilidad para las técnicas de precipitación; estas dificultades se empezaron a resolver al introducir Farr²⁰⁷ la técnica que lleva su nombre, quien inicialmente utilizó albúmina como antígeno, para medir la cantidad del anticuerpo. Esta técnica fue modificada por Wold, Young, Tan y Farr²⁰⁸ (Figura 17) en 1968, Pincus, Schur y Talal²⁰⁹ en el mismo año y Pincus, Schur, Rose, Decker y Talal²¹⁰ en 1969, quienes perfeccionan la técnica y en vez de utilizar la albúmina, utilizan el ADN, así de esta manera se empieza a cuantificar el ADN libre y el unido al anticuerpo (técnica conocida como de Farr).

De las viejas técnicas que identifican a los anticuerpos contra el ADN de doble cadena o que precipi-

tan con el ADN, se empezaron a utilizar otras técnicas como la de Farr, en la cual el ADN es radiomarcado y se incuba con el suero y los complejos ADN-anti-DNA que son precipitados con sulfato de amonio o polietilenglicol. Estas pruebas son bastante específicas para los pacientes con glomerulonefritis²⁰⁴.

Posteriormente se desarrolla la técnica de la *Crithidia luciliae* (Figura 18) utilizan el ADN circular que se encuentra en el kinetoplasto de un protozooario y las técnicas de ELISA, que son técnicas más sencillas y más ágiles y se utilizan de rutina en los laboratorios clínicos²⁰⁴.

Los aportes fundamentales de Tan lograron ayudar a entender los eventos básicos de la proliferación y del ciclo celular, así como aspectos relevantes de diversas enzimas como las topoisomerasas, los ARN polime-

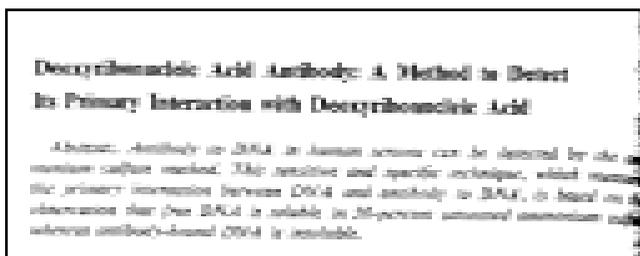


Figura 17. Encabezado del artículo de Tan en compañía con Wold, Young y Farr publicado en "Science" en agosto de 1968.

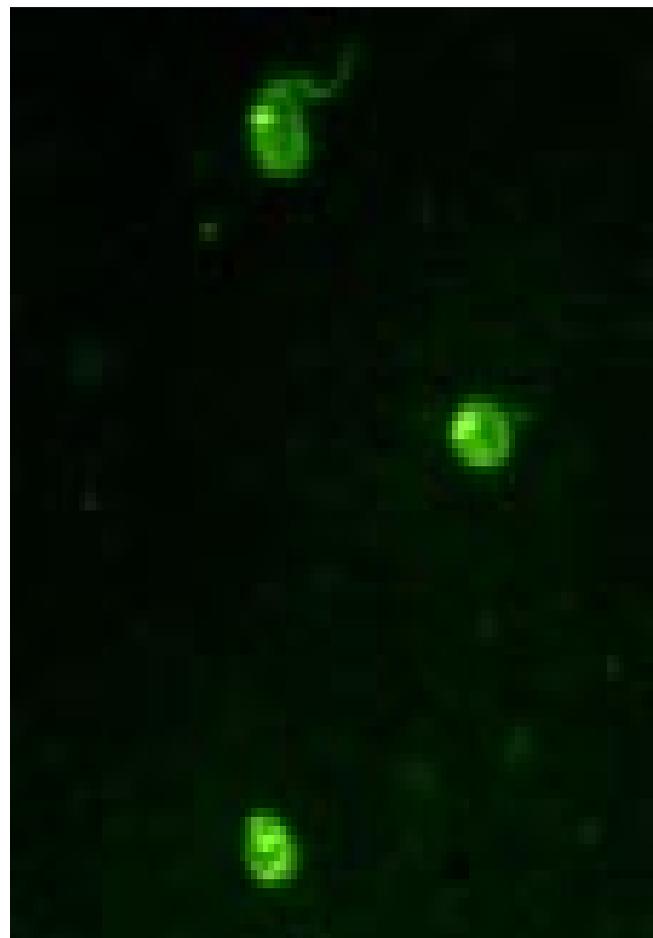


Figura 18. Anticuerpos anti-DNA por técnica IFI *Crithidia luciliae*. La fluorescencia se observa en el kinetoplasto donde se encuentra el ADN circular.

rasas, las sintetetasas y las diversas proteínas involucradas en la mitosis que vamos a mencionar¹⁹⁶. Posteriormente Tan conformó su grupo de la Scripp Clinic, en la que bajo su égida se forman muchos inmunólogos latinoamericanos como Pedro Reyes en 1971, Ignacio García de la Torre y Rafael Herrera Esparza (Figura 19) en México que fue alumno de Lucien Aarden; Antorio Fraga y Ruud JT. Smeen K, Pedro Reyes, J. de Jong y Luis Daza empezaron a diseminar la llama de los anticuerpos que heredaron de Tan¹⁹⁶. Previamente Donato Alarcón-Segovia (Figura 20) quien se formó en reumatología y especialmente con Khalil Wakim y con Frederick McDuffie (Figura 21) en el laboratorio de inmunología, aprendió las técnicas de los anticuerpos antinucleares que la llevo a México y con la colaboración de Eugenia Fishbein la implementan en el Instituto Nacional de la Nutrición.

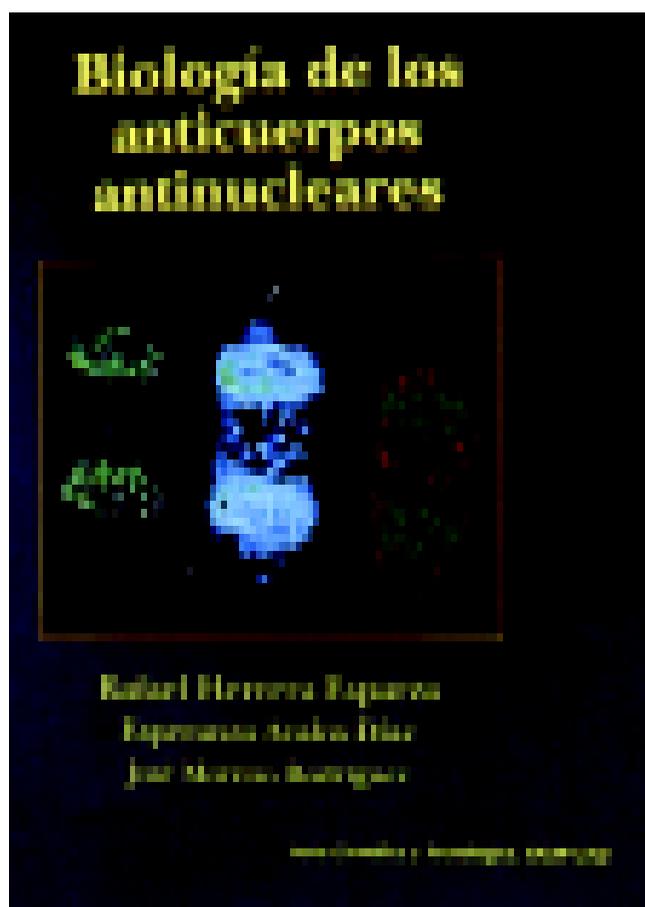


Figura 19. Libro de biología molecular de Rafael Herrera.



Figura 20. Donato Alarcón-Segovia en su paso por la Mayo Clinic como fellow de reumatología.



Figura 21. Frederick McDuffie, fue uno de los primeros en impulsar los laboratorios de inmunología aplicada a la reumatología, profesor de Donato Alarcón Segovia.

En Colombia Javier Molina alumno de George Friou, en la ciudad de Medellín y Manuel Elkin Patarroyo, alumno de Kunkel, implementa las técnicas de los anticuerpos en el hospital San Juan de Dios de Bogotá²¹¹.

La Escuela de Henry Kunkel

Este investigador organiza el laboratorio de inmunología en la década de 1950 en el Rockefeller

Institute e inicia las investigaciones sobre inmunoglobulinas en pacientes con mieloma múltiple. Tiene contactos con investigadores suecos, especialmente Anne Tiselius (premio Nobel en Medicina) y a su regreso se dedica al estudio de la caracterización inmunológica del factor reumatoide.

Este extraordinario maestro de la inmunología mundial (Figuras 22 y 23) es reconocido por sus grandes discípulos que no sólo establecieron conceptos básicos para entender el lupus, sino desarrollaron técnicas para lograr imbricar los conceptos básico-clínicos. Algunos de sus discípulos, ya los mencionamos, como WC Robbins, Halsted Holman, H Deicher, P Lachmann, HJ Müller-Eberhard, F Paronetto, RI Carr, John Zabriskie, Peter Schur, D Koffler, y otros que no hemos mencionado como Robert Winchester, Gybosky, Manuel Elkin Patarroyo y Luis Espinoza.

En 1985 en el “ARA memorial lectures” se hizo honor al inmunólogo Henry Kunkel, quien murió en 1983 a la edad de 67 años. En 1984-1985 Eng Tan, presidente de la ARA, describió a su maestro como el fundador de la inmunología clínica en USA y Frank J Dixon quien en 1985 inauguró con su presentación una serie

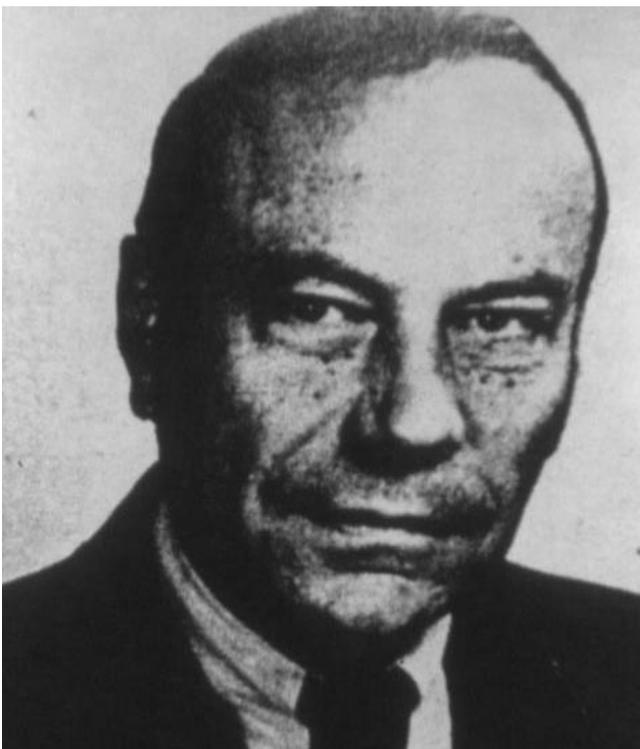


Figura 22. Henry Kunkel.



Figura 23. Henry Kunkel y Manuel Elkin Patarroyo junto con Müller-Eberhard, Cochrane y Frank Dixon en el Congreso Internacional de inflamación que se realizó en Bogotá en 1979.

de “Annual memorial lectures”, que sirvió después a la ARA Scientific meeting para honrar a prominentes investigadores en este campo. Posteriormente se crean tres tipos de lecturas – Henry G. Kunkel, Paul Klemperer y la de Edmund Lawrence Dubois, tres investigadores prominentes en el estudio del lupus. Estos tres personajes, en especial Kunkel junto con sus discípulos le dieron un vuelco al conocimiento de los anticuerpos y dos de sus discípulos, Eng Tan y Morris Reichlin (Figura 24) le hacen un homenaje póstumo al ganar los premios que llevan su nombre. Kunkel fue el primer investigador en demostrar que los antisueros se pueden realizar en el laboratorio, un descubrimiento que permitió discriminar cada anticuerpo y con esto creó una brecha en la investigación científica, en el campo del lupus en especial. Las técnicas desarrolladas en el laboratorio originaron las bases para el entendimiento de la clasificación de los anticuerpos, los estudios de genética para el control de la producción de los anticuerpos y otra serie de investigaciones para el entendimiento de las enfermedades autoinmunes.

Uno de los discípulos del maestro Henry Kunkel es el profesor y maestro de la Scripps Research Institute Eng M. Tan. Tan se une al laboratorio del profesor Henry Kunkel de la universidad de Rockefeller en 1962, quien tenía experiencia en inmunofluorescencia tisular trabajando al lado de Melvin Kaplan del Case Western Reserve University²¹². Dos artículos publicados por Tan



Figura 24. Morris Reichlin.

fueron puntuales en el avance del conocimiento de los anticuerpos y es la identificación del antígeno Sm, que no es ni ADN, ni es nucleoproteína y se encuentra en los núcleos de tejidos de origen bovino y humano¹⁵⁷. El antígeno Sm lleva el nombre de una joven paciente con lupus llamada Stephanie Smith quien tenía un talento para la pintura. La caracterización bioquímica de este antígeno nuclear, el cual era un autoantígeno nuclear no histona, permitió la caracterización de una gran variedad de otros antígenos nucleares y anticuerpos¹⁵⁷. Posteriormente se demostró que los anticuerpos anti-Sm son actualmente específicos para el lupus, y su especificidad tiene alguna variabilidad racial^{157, 212}.

El otro trabajo fundamental de Tan, en el que participaron Carr, Schur y Kunkel¹⁵⁵, fue la demostración de la primera evidencia de un antígeno en un complejo inmunitario en 1966, al demostrar el antígeno y el anticuerpo anti-DNA en un estudio en donde se observó en forma seriada por técnicas de precipitación y de fijación de complemento y lograron demostrar que en determinados períodos el ADN (antígeno) y el anticuerpo anti-DNA ocurren simultáneamente. Este estudio les

permitió, un año después, a Koffler, Schur y Kunkel¹⁸⁹, en 1967, confirmar la presencia del ADN en forma de depósitos de complejos inmunes en los riñones de pacientes con lupus. Estos dos artículos^{156, 209} y el artículo de Farr²⁰⁷ le permitieron a Wold y cols²⁰⁸ y a Pincus y cols^{211, 213} (Figura 25 y 26) desarrollar los métodos para medir los anticuerpos contra el ADN.

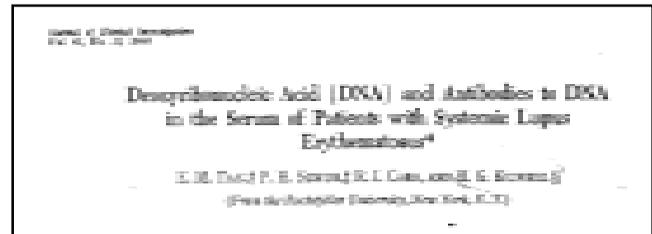


Figura 25. Encabezado del artículo de Tan y Schur



Figura 26. Encabezado del artículo de Pincus publicado en "New England Journal of Medicine" en septiembre de 1969.

Anticuerpos específicos

Como se mencionó anteriormente, en 1966 se describió la primera proteína no histona designada como Sm (por Stephanie Smith), que fue uno de los primeros anticuerpos específicos para el diagnóstico del lupus; tres años después, en 1969, se empezaron a reconocer los primeros antígenos citoplasmáticos conocidos como SSA o Ro basados en las primeras iniciales del paciente en que se demostrara esta asociación de acuerdo a la moda impuesta por Tan¹⁹⁶. Tres años después de esta descripción, Gordon Sharp, Irvin y Tan^{151, 152} describen otro anticuerpo específico, el UI-RNP asociado con la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo. Estos descubrimientos dieron las bases para que Alarcón-Segovia, Ruiz Argüelles y Eugenia Fishbein²¹⁴ describieron la teoría de la penetración del anticuerpo y le abrieran el campo y el interés a científicos básicos como Steitz, Lerner y Hardin^{196, 215-217} para identificar la estructura molecular y la función biológica de los autoantígenos nucleares y

citoplasmáticos y para definir algunos conceptos para el conocimiento fundamental de la maduración y el procesamiento del ARN. De esta manera Lerner y Steitz demuestran que los anticuerpos específicos anti-Sm y anti-UI – RNP reaccionaban con proteínas, las cuales eran componentes de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (sn RNPs) que participan en la maduración y procesamiento del ARN.

La teoría vigente radica en la presencia de unas proteínas que interactúan con el ARN U1 (rico en uridina) para dar lugar al ARN mensajero. Por medio de un proceso conocido como “splicing” se forma el RNA mensajero y al conjunto de ARN y polipéptidos se les conoce con el nombre de “spliceosoma”; estos términos no tienen expresiones adecuadas en el español, aunque puede entenderse como empalme o ensamblaje, y la inmunoreactividad que se desarrolla contra algunas proteínas que hacen parte de ellas pueden explicar parte de los procesos patogénicos y clínicos que ocurren en las diferentes enfermedades del tejido conectivo. Exactamente son ocho los polipéptidos que se unen al ARN en este proceso. Los péptidos de 68 KDa y 33 KDa (A) reaccionan con los sueros que poseen anticuerpos anti RNP U1 y los péptidos de 28 KDa (B), 29 KDa (B') y de 16 KDa (D) reaccionan con los anticuerpos anti Sm. Estos son conocidos como Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (sn RNPs) y a éstas se les denomina por letras mayúsculas desde la A hasta la G. A su vez, los anticuerpos anti Sm también inmunoprecipitan con diferentes isotipos, los U1, U2, U4, U5 y U6. Con respecto a los anticuerpos anti Ro y anti La, se dirigen contra tres tipos de proteínas, SS-A/Ro de 60 KDa, SS-A/Ro de 52 KDa y SS-B/La de 48 KDa, las cuales están unidas a cuatro pequeños ARN conocidos como hY1, 2, 3 y 5²¹⁸.

Otro discípulo de Kunkel, Morris Reichlin, en conjunción con Mattioli²¹⁹, aportaron en el conocimiento de otros anticuerpos específicos como el Ro (SSA) y Alspaugh y Tan²²⁰ al SSB o La, para el diagnóstico de algunos subgrupos clínicos del lupus y del síndrome de Sjögren primario y otros aportes de antígenos relacionados con miositis.

Esta unión de clínicos y básicos empezaron a dar sus frutos como fue el desarrollo de clones y librerías de ADN complementario (c-DNA)²²¹ para el estudio de antígenos de interés y así de esta manera la combinación de las técnicas inmunológicas y moleculares han logrado caracterizar e identificar la mayoría de los com-

ponentes del sistema de autoantígenos y autoanticuerpos comprendidos en esa gama de enfermedades autoinmunes sistémicas en la cual el lupus es su prototipo y los anticuerpos, como lo define Tan, son los reporteros del sistema inmunitario que permiten al organismo detectar la presencia de autoantígenos inmunogénicos²²².

Referencias

- 1 Lain Entralgo P. Historia universal de la medicina. Salvat Editores, S. A.
- 2 Stites DP, Terr AI. Basic and clinical Immunology. Seventh edition Prentice – Hall International INC, 1991; pp: 1-8.
- 3 Metschnikoff E. L'Immunité dans les maladies Infectieuses, Paris, 1901.
- 4 Bordet J. Sur L' agglutination et al dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux in jectés sang défibriné. Ann Inst Pasteur 1988; 12: 688.
- 5 Krauss R. Ueber spezifische Niederschläge (Präzipitine). Handb der pathol. Mikroorg IV, Jena 1904.
- 6 Ehrlich P. Ueber die Immunität durch Vererbung und Säugung. Z Hyg 1892; 12: 183-188.
- 7 Ehrlich P. On Immunity with special reference to cell life. Proc R Soc Lond 1900; 66: 424.
- 8 Wright AE, Douglas SR. An Experimental Investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. Proc Roy Soc 1903-4; 72: 357.
- 9 Portier P, Richet ChR. De L'action anaphy lactique de certains venins. C R Soc Biol 1902; 54: 170.
- 10 Pirquet CL. Von, Schick KB. Die serumkrankheit, Wien 1905.
- 11 Hargraves MM. Production in vitro of L. E. cell phenomenon: Use of normal bone marrow elements and blood plasma from patients with acute disseminated lupus erythematosus. Proc Staff Meet Mayo Clin 1949; 24: 234-237.
- 12 Hargraves MM. Discovery of the L. E. cell and its morphology. Mayo Clin Proc 1969; 44: 579-599.
- 13 Gross L. The heart in atypical verrucous endocarditis (Libman-Sacks). Contributions to the medical sciences colleagues, in honor of Dr. Emanuel Libman by this friend colleagues, in three volumes. The international Press, New York, 1932; 2: 527-550.
- 14 Gross L. Cardiac lesions in Libman-Sacks disease with consideration of its relationship to acute diffuse lupus erythematosus. Am J Path 1940; 16: 375-407.
- 15 Ginzler AM, Fox TT. Disseminated lupus erythematosus: Cutaneous manifestation of systemic disease (Libman-Sacks); report of case. Arch Int Med 1940; 65: 26-50.
- 16 Klemperer P, Gueft B, Lee SL et al. Cytochemical changes of acute lupus erythematosus. Arch Patol 1950; 49: 503-515.
- 17 Haserick JR, Bortz DW. A new diagnostic test for acute disseminated lupus erythmatosus. Cleveland Clin Quart 1949; 16: 158-161.
- 18 Haserick JR, Bortz DW. Normal bone marrow inclusion phenomena induced by lupus erythematosus plasma. J Invest Derm 1949; 13: 47-51.
- 19 Haserick JR, Lewis LA. Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus: Induction of specific antibodies against L. E. factor Blood 1950; 5: 718-722.

- 20 Haserick JR, Lewis LA, Bortz DW. Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus; Determination of gamma globulin as specific plasma fraction. *Am J Med Sci* 1950; 219: 660-663.
- 21 Rohn RJ, Bond WH. The dynamics of L. E. cells supravital stained. *J Lab Clin Med* 1951; 38: 944-951.
- 22 Rohn RJ, Bond WH. Some observations on the "L. E" phenomenon. *Am J Med* 1952; 12: 422-432.
- 23 Rohn RJ, Bond WH. Time microcinematography of the L. E. phenomenon. *J Lab Clin Med* 1953; 42: 939-946.
- 24 Zimmer FE, Hargraves MM. The effect of blood coagulation on L. E. cell formation. *Proc Staff Mayo Clin* 1952; 27: 424-430.
- 25 Barnes SS, Moffatt TW, Weiss RS. Demonstration of the L. E. cell in the absence of anticoagulant. *J Invest Derm* 1950; 14: 397-400.
- 26 Gonyea LM, Kallsen RA, Marlow AA. Occurrence of the "L. E." cell in clotted blood. *J Invest Dermatol* 1950; 15: 11-12.
- 27 Eppes W, Ludovic E. Demonstration of "L. E." cell without use of anticoagulants. *Blood* 1951; 6: 466-469.
- 28 Lee SL. Simple test for L. E. cells. *Amer J Clin Pathol* 1951; 21: 492-496.
- 29 Suksta A, Conley CL. Some observations on the L. E. cell. *J Lab Clin Med* 1951; 37: 597-602.
- 30 Zinkham WH, Conley CL. Some factors influencing the formation of L. E. cells. *Bull Johns Hopk Hop* 1956; 98: 102.
- 31 Fallet GM, Lospalluto J, Ziff M. Chromatographic and electrophoretic studies of the L. E. factor. *Arthritis Rheum* 1958; 1: 419.
- 32 Berman L, Axelrod AR, Goodman FL, Mc Claughy RI. The so-called "Lupus Erythematosus inclusion phenomenon" of bone marrow and blood. *Am J Clin Path* 1950; 20: 403.
- 33 Willkens RF, Decker JC. Rheumatoid arthritis with serologic evidence suggesting systemic lupus erythematosus. *Clinical Serologic and chromatographic. studies Arthritis Rheum* 1963; 6: 720-735.
- 34 Godman GC, Deitch AD. A cytochemical study of the L. E. bodies of systemic lupus erythematosus. *Nucleic acids. J Exp Med* 1957; 106: 575.
- 35 Godman GC, Deitch AD. A cytochemical study of the L. E. bodies of systemic lupus erythematosus. *Nucleic acids. J Exp Med* 1957; 106: 593.
- 36 Larson DL. "Systemic lupus erythematosus" Little, Brown Co. Boston, 1961.
- 37 Klemperer P, Pollack AD, Baehr G. On the nature of acute lupus erythematosus. *NY State J Med* 1942; 42: 2225-2226.
- 38 Klemperer P, Pollack AD, Baehr G. Pathology of disseminated lupus erythematosus. *Arch Path* 1941; 32: 569-631.
- 39 Gueft B. Depolymerization of nucleic acid in acute disseminated lupus erythematosus. *Arch Derm* 1950; 61: 892-7.
- 40 Gueft B, Laufer A. Further cytochemical studies in systemic lupus erythematosus. *Arch Path* 1954; 57: 201-26.
- 41 Pollister AW, Leuchtenberger C. The nature of the specificity of methyl green for chromatin. *Proc Nat Acad Sci* 1949; 35: 111-6.
- 42 Lee SL, Michael SR, Vural IL. The L. E. (lupus Erythematosus) cell. Clinical and chemical studies. *Am J Med* 1951; 10: 446-451.
- 43 Miescher P, Fauconnet M, Beraud T. Experimental Immuno - nucleio phagocytosis and the L. E. phenomenon. *Exp Med Surg* 1953; 11: 173-179.
- 44 Miescher P, Fauconnet M. Antigenic compounds of the polynuclear leucocyte and their clinical importance. *Schweiz Med Wschr* 1954; 84: 1036-1038.
- 45 Miescher P, Fauconnet M. Absorption of the L. E. factor by Isolated cell nuclei. *Experientia* 1954; 10: 252-254.
- 46 Cepellini R, Polli E, Celada F. DNA - reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 96: 572-574.
- 47 Polli E, Celada F, Cepellini R. A proposito di un fattore serico del lupus eritematoso sistemico, reagente con L'acide desossipentose nucleico. *Boll I S M* 1957; 36: 1-5.
- 48 Seligmann M, Robineaux R. Induction du phénomène L. E. par L'anticorps anti-acide desoxyribonucléique isolé a partir du sérum de malades atteints de lupus érythémateux dissémine. *CR Acad Sci* 1958; 246: 1472-1478.
- 49 Seligmann M. Immunologic studies on disseminated lupus erythematosus. *Rev. Franç Etud Clin Biol* 1958; 3: 558-584.
- 50 Seligmann M. Immuno-electrophoretic study of the serum during the course of systemic lupus erythematosus in "Immuno-electrophoretic Analyses. Applications to human biological fluids". P. Grabar and P. Burtin (eds). Elsevier Publishing Co. Amsterdam, London and New York, 1964; pp: 209-214.
- 51 Holman HR, Kunkel HG. Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science* 1957; 126: 162-163.
- 52 Holman HR, Deicher HR. The reaction of the L. E. cell factor with deoxyribonucleoprotein of the cell nucleus. *J Clin Invest* 1959; 38: 2059-2072.
- 53 Holman HR, Deicher HR, Kunkel HG. The L. E. cell and the L. E. serum factors. *Bull NY Acad Med* 1959; 35: 409-418.
- 54 Holman HR, Kunkel HG. Antinuclear antibodies and their detection in systemic lupus erythematosus (S. L. E.). *Bull Rheum Dis* 1959; 10: 197-198.
- 55 Deicher HR, Homan HR, Kunkel HG. The precipitin reaction between DNA and serum factor in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1959; 109: 97-114.
- 56 Seligmann M, Hanau C. Étude immunoélectrophorétique du sérum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé. *Rév Hematol* 1958; 13: 139-145.
- 57 Hijmans W, Schuit HRE. Studies on the L. E. cell phenomenon. *Vox Sang* 1958; 3: 184-192.
- 58 Hijmans W, Kievits JH, Schuit HR. The diagnostic significance of a positive L. E. cell phenomenon. *Acta Med Scand* 1958; 61: 341-345.
- 59 Holman HR. Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus in: *Inflammation and diseases of connective tissue*. Edited by Lewis C. Mills - John H. Moyer. W. B. Saunders Company Philadelphia, London, 1961; pp: 123-124.
- 60 Bondi A. Panel discussion in: *Inflammation and disease of connective tissue*. Edited by Lewis C. Mills - John H. Moyer. W. B. Saunders Company Philadelphia, London, 1961; pp: 125-132.
- 61 Rifkind R, Godman G. Phase contrast and interferometric microscopy of the L. E. phenomenon. *J Exp Med* 1957; 106: 607-616.
- 62 Godman GC. The nature and pathogenetic significance of the L. E. cell phenomenon of systemic lupus erythematosus in: *A Mount Sinai Hospital monograph of systemic lupus*

- erythematosus. Editors George Baehr and Paul Klemperer. Grune & Stratton New York, London, 1959; pp: 17-36.
- 63 Kievits JH, Goslings J, Schuit HR et al. Rheumatoid arthritis and the positive L. E. cell phenomenon. *Ann Rheum Dis* 1956; 15: 211-216.
- 64 Rothfield NE, Phythyon JM, Mc Ewen C et al. The role of antinuclear reactions in the diagnosis of systemic lupus erythematosus: a study of 53 cases. *Arthritis Rheum* 1961; 4: 223-239.
- 65 Friou GJ. Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957; 36: 890-897.
- 66 Friou GJ. Immunofluorescence and antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1964; 7: 161-166.
- 67 Godman G, Deitch AD, Klemperer P. On the composition of the haematoxylin bodies of systemic lupus erythematosus. *Am J Path* 1956; 34: 1-23.
- 68 Coons AH. Histochemistry with labelled antibody *Inte. Rev Cytol* 1956; 5: 1-5.
- 69 Friou GJ, Finch SC, Detre KD. Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. *J Immunol* 1958; 80: 324-329.
- 70 Friou GJ, Teague PO. Auto - antibody like antinuclear globulin in A/J mice. *Arthritis Rheum* 1963; 7: 773-774.
- 71 Friou GJ, Teague PO. Spontaneous autoimmunity in mice: to nucleoprotein in strain. *A J Science* 1964; 143: 1333-1334.
- 72 Friou GJ. Immunofluorescence and antinuclear antibody. *Arthritis Rheum* 1964; 7: 161-166.
- 73 Kunkel HG, Holman HR, Deicher HRG. Multiple autoantibodies to cell constituent in systemic lupus erythematosus. *Ciba Found Symp* 1960; 8: 429-437.
- 74 Stollar DL. Reactions of systemic lupus erythematosus sera with histone fractions and histone - DNA complexes. *Arthritis Rheum* 1971; 14: 485-492.
- 75 Marrack J. Nature of antibodies. *Nature* 1934; 133: 292-293.
- 76 Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by use of fluorescent antibody. *J Immunol* 1942; 45: 159-170.
- 77 Weller TH, Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 86: 789-794.
- 78 Goldwasser RA, Shepard CC. Fluorescent antibody methods in the differentiation of murine and epidemic typhus sera: Specificity changes resulting from previous immunization. *J Immunol* 1959; 82: 373-380.
- 79 Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Farad Soc* 1937; 33: 524-531.
- 80 Tiselius A, Kabat EA. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J Exp Med* 1939; 69: 119-127.
- 81 Svedberg T, Pedersen K. The ultracentrifuge. Oxford, Clarendon, 1940, pp: 78.
- 82 Waldenström J. Incipient myelomatous or essential "hyperglobulinemia with fibrinogenemia: a new syndrome? *Acta Med Scand* 1974; 117: 216.
- 83 Heremans JF. Immunochemical studies on protein pathology. The immunoglobulin concepts. *Clin Chim Acta* 1959; 4: 639.
- 84 Lain Entralgo P. Historia universal de la medicina. Salvat Editores S. A. 1975, reimpresión 1980, tomo IV, pp: 162-178.
- 85 Rowe DS, Fahey JL. A new class of human immunoglobulins. II normal serum IgD. *J Exp Med* 1965; 121: 185.
- 86 Ishizaka K, Ishizaka T. "Characterization of human reaginic antibodies ". In: B. Rose, M Richter, Asehon and A. W. Frankland (eds). *Allegory. International Congress Series No. 162. Excerpta Médica Foundation. Amsterdam, 1968; 256.*
- 87 Bennich H, Johansson SGO. "Structure and function of human immunoglobulin E". *Adv Immunol* 1971; 13: 1-8.
- 88 Porter RR. The structure of gamma - globulins and antibodies In : A Gellhorn E. Hirschberg (eds). *Basic problems of neoplastic disease. Columbia University Press, New York, 1962; 177.*
- 89 Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Wazdal MJ. The covalent structure of an entire gamma - G -immunoglobulin molecule. *Proc Nat Acad Sci* 1969; 10: 63-78.
- 90 Öuchterlony O. Diffusion in - gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 1958; 5: 1.
- 91 Öuchterlony O. Diffusion in - gel methods for immunological analysis. II *Prog Allergy* 1962; 6: 1.
- 92 Grabar P, Burtin P. *Analyse immuno - electrophorétique. Masson et Cie, Paris, 1960.*
- 93 Coombs RRA, Mourant A, Race A. A new test for detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins *Brit. J Exp Pathol* 1945; 26: 255.
- 94 Mayer MM. " Complement and complement fixation" In: E. A. Kabat *Experimental immunochemistry. Second edition. Charles C, Thomas Publisher, Springfield, 1961, pp: 133.*
- 95 Müller - Eberhard HJ. Chemistry and reaction mechanisms of complement. *Adv Immunol* 1969; 8: 1.
- 96 Lepow IH. Biologically active fragments of complement. *Progr Immunol* 1971; 1: 579.
- 97 Coons AH. The beginning of immunofluorescence. *J Immunol* 1961; 87: 449.
- 98 Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat Lond* 1944; 78: 16.
- 99 Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity. *Vanderbilt University Press, Nashville, 1959.*
- 100 Burnet, Sir M. *Auto- immunity and auto - immune disease. Medical and technical Publishing Co, Lancaster, 1972.*
- 101 Miller JFAP, Marshall AHE, White RG. The immunological significance of the thymus. *Adv Immunol* 1962; 2: 111.
- 102 Good RA. Structure - function relations in the lymphoid system. *Clin Immunobiol* 1972; 1: 1.
- 103 Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *JAMA* 1957; 164: 1439-1447.
- 104 Doniach D, Roitt IM. Auto - antibodies in disease. *Am Rev Med* 1962; 13: 213-214.
- 105 Friou GJ. The significance of the lupus globulin - nucleoprotein reaction. *Ann Inter Med* 1958; 49: 886-894.
- 106 Friou GJ. Identification of the nuclear component of the interaction of lupus erythematosus globulin and nuclei. *J Immunol* 1958; 80: 476-481.
- 107 Friou GJ. Clinical application of a test for lupus globulin nucleohistona interaction using fluorescent antibody. *Yale J Biol Med* 1958; 31: 40-47.
- 108 Robbins WC, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 96: 575-579.
- 109 Holman HR, Deicher H, Robbins WC. Antinuclear antibodies in lupus erythematosus In: *Symposium on Hypersensitivity. Little, Brown and Co, Boston, 1959.*

- 110 Holman HR, Robbins WC, Deicher H, Kunkel HC. Antinuclear antibodies in lupus erythematosus (abs). *Science* 1957; 126: 1231-1234.
- 111 Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Brit Med J* 1957; 2: 722-734.
- 112 Holborow EJ, Weir DM. Histone: an essential component for the lupus erythematosus antinuclear reaction. *Lancet* 1959; 1: 809-810.
- 113 Mellors RC, Ortego LG, Holman HR. Role of gamma globulins in pathogenesis of renal lesions in systemic lupus erythematosus cell reaction. *J Exp Med* 1957; 106: 191-202.
- 114 Alexander WRM, Duthie JJR. Reaction of lupus erythematosus serum with nuclei of circulating and non circulating cell. *Brit Med J* 1958; 2: 1565-1566.
- 115 Alexander WRM, Bremner JM, Duthie JJR. Incidence of the anti - nuclear factor in human sera. *Ann Rheum Dis* 1960; 19: 338-350.
- 116 Calabresi P, Edward EA, Schilling RF. Fluorescent antiglobulin studies in leucopenic and related disorders. *J Clin Invest* 1959; 38: 2091-2100.
- 117 Baugh CW, Kirol PM, Sachs MV. Demonstration and titration of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Canad Med Ass* 1960; 83: 571-580.
- 118 Rowell NR. The natural history of lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol* 1984; 9: 217-231.
- 119 Beck JS, Rowell NR. Transplacental pasaje of antinuclear antibody. *Lancet* 1963; 1: 134-135.
- 120 Esscher E, Scout JS. Congenital Herat block and maternal systemic lupus erythematosus. *British Med J* 1979; 1: 1235-1238.
- 121 Beck JS, Rowell NR. Discoid lupus erythematosus. A study of the clinical features and biochemical and serologic abnormalities in 120 patients with observations on the relationship of this disease to systemic lupus erythematosus. *Quart J Med* 1966; 135: 119-134.
- 122 Rowell NR, Beck JS, Anderson JR. lupus erythematosus and Erythema multiforme - like lesions. *Arch Dermatol* 1963; 88: 176-180.
- 123 Beck JS. Variations in the morphological patterns of "Autoimmune" nuclear fluorescence. *Lancet* 1961; 1: 1203-1205.
- 124 Beck JS, Anderson JR, McElhinney AJ, Rowell NR. Antinucleolar antibodies. *Lancet* 1962; 2: 575-577.
- 125 Beck JS. Partial identification of the "Speckled" nuclear antigen. *Lancet* 1962; 1: 241-242.
- 126 Beck JS. Investigations into the affinity of some preparations of human serum albumin for cell nuclei. *Exp Cell Res* 1962; 26: 296-303.
- 127 Beck JS. The behaviour of certain nuclear antigens in mitosis. *Exp Cell Res* 1962; 28: 406-418.
- 128 Beck JS. Auto-antibodies to cell nuclei. *Scot Med J* 1963; 8: 373-388.
- 129 Beck JS. Human antinuclear antibodies: An immunological, Clinical and histochemical study. Thesis. University of Glasgow, 1964.
- 130 Beck JS, Walker PJ. Antigenicity of trypanosome nuclei: evidence that DNA is not coupled to histone these protozoa. *Nature London*, 1964; 204: 194-195.
- 131 Beck JS, Scott GB, Munro HN, Waddington S, MacSeveny D. A new immuno. chemical technique for electron microscopic study of nuclear structure using human antinuclear antibodies. *Exp Cell Res* 1965; 39: 292-296.
- 132 Beck JS, Paterson Joan C. Nuclear antigens in normal and leukaemic leucocytes: a histochemical study using human auto-immune antinuclear antibodies. *J Path Bact* 1965; 90: 567-578.
- 133 Beck JS, Hughes P. Classification of lupus erythematosus. *Lancet* 1966; 2: 442.
- 134 Stewart JM, Beck JS. Distribution of the DNA and the DNA histone antigens in the nuclei of free-living and parasitic sarcomastigophora. *J Protozool* 1967; 14: 225-231.
- 135 Lachmann PJ, Kunkel HG. Correlation of antinuclear antibodies and nuclear staining patterns. *Lancet* 1961; 2: 436-437.
- 136 Fennell RH, Rodnan GP, Vásquez JJ. Variability of tissue-localizing properties of serum from patients with different disease states. *Lab Invest* 1962; 11: 24-31.
- 137 Bardawill WA, Pachas WN, Sbarra AJ, Turrubiarte V. Antinucleolar globulins in collagen diseases. (Abstr) *Fed Proc* 1962; 21: 12.
- 138 Burnham TK, Neblett TR, Fine G. The Immunofluorescent tumor imprint technic I. Description and evaluation. *Amer J Clin Path* 1966; 45: 714-721.
- 139 Burnham TK, Kleinsmith D'Anne M. The "true speckled" antinuclear antibody (ANA) pattern: its tumultuous history. *Sem in Arthritis Rheumatism* 1983; 13: 155-159.
- 140 Burnham TK, Fine G, Neblett TR. The immunofluorescent tumor imprint technique. II. The frequency of antinuclear factors in connective tissue diseases and dermatoses. *Ann Intern Med* 1966; 65: 9-19.
- 141 Burnham TK, Neblett TR, Fine G. The immunofluorescent ent tumor imprint rechnique: III. The diagnostic and pronostic significance of the "speckle" inducing antinuclear antibody. *Am J Clin Pathol* 1968; 50: 683-688.
- 142 Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, et al. Complexity of antinuclear antibodies in escleroderma. *Athritis Rheum* 1979; 22: 640.
- 143 Moroi Y, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to chromosomal centromere (Kinetochores) in scleroderma sera. *Clin Res* 1979; 27: 513A.
- 144 Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, et al. Autoantibody to centromere (Kinetochores) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 627-631.
- 145 Fritzler MJ, Kinsella TD, Garbutt E. The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med* 1980; 69: 20-26.
- 146 Burnham TK, Neblett TR, Fine G. Comments on antinuclear antibodies (letter to the editor). *Arch Dermatol* 1968; 97: 99.
- 147 Burnham TK, Neblett TR, Fine G. Nuclear immunofluorescent patterns (letter to the editor). *Arch Dermatol* 1969; 99: 354-365.
- 148 Burnham TK. Antinuclear antibodies in lupus erythematosus (letter to the editor). *Arch Dermatol* 1976; 112: 1329.
- 149 Burnham TK, Bank PW. Antinuclear antibodies: I. Patterns of nuclear immunofluorescence. *J Invest Dermatol* 1974; 62: 526-534.
- 150 Burnham TK. Nuclear immunofluorescent patterns in mixed connective tissue disease (MCDT) (letter to the editor). *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 95-96.
- 151 Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, et al. 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; 148-159.

- 152 Sharp GC, Anderson PC. Current concepts in the classification of connective tissue diseases. Overlap syndromes and mixed connective tissue disease (MCTD). *J Am Acad Dermatol* 1980; 2: 269-279.
- 153 Burnham TK. Antinuclear antibodies-clinical significance of the nuclear immunofluorescent patterns (letter to the editor). *Am J Clin Pathol* 1975; 64: 289-290.
- 154 Husain M, Neff J, Daily E, et al. Antinuclear antibodies. Clinical significance of titers fluorescence patterns. *Am J Clin Pathol* 1974; 61: 59-65.
- 155 Ritchie RF. Two new antinuclear antibodies. Their relationship to the homogeneous immunofluorescent pattern. *Arthritis Rheum* 1968; 11: 37-43.
- 156 Bonomo L, Tursi A, Dammacco F. Characterization of the antibodies producing the homogeneous and speckled fluorescence patterns of cell nuclei. *J Lab Clin Med* 1965; 66: 42-52.
- 157 Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1966; 96: 467-471.
- 158 Tan EM. Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 1968; 70: 800-812.
- 159 Casals SP, Friou GJ, Teague P. Varieties of antinuclear factors detected by fluorescent antiglobulin techniques. (Abstr) *Arthritis Rheum* 1962; 5: 650.
- 160 Casals SP, Friou GJ, Teague P. Specific nuclear reaction pattern of antibody to DNA in lupus erythematosus sera. *J Lab Clin Med* 1963; 62: 625-631.
- 161 Courvalin JC, Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantibodies in primary biliary cirrosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 79-90.
- 162 Worman HJ, Courvalin JC. Autoantibodies against nuclear envelope proteins in liver disease. *Hepatology* 1991; 14: 269-277.
- 163 Goldberg M, Harel A, Brandeis M, Rechsteiner T, Richmond TJ, Weiss AM, et al. The tail domain of lamin DmO binds histones H2A and H2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2852-2857.
- 164 YJ. Antinuclear envelope antibodies: clinical associations. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30: 313-320.
- 165 Reeves WH, Chaudhary N, Salerno A, Blobel G. lamin B autoantibodies in sera of certain patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1987; 165: 750-762.
- 166 Wesierska-Gadek J, Penner E, Hitchman E, Sauermann G. antibodies to nuclear lamins in autoimmune liver disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 49: 107-115.
- 167 Dagenais A, Bibor-Hardy V, Senecal JL. A novel autoantibody causing a peripheral fluorescent antinuclear antibody pattern is specific for nuclear pore complexes. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1322-1327.
- 168 Senecal JL, Oliver JM, Rothfield N. Cytoskeletal autoantibodies in connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 1985; 18: 889-898.
- 169 Senecal JL, Rauch J, Grodzicky T. Stron association of autoantibodies to human lamin B1 With lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 7: 1347-1353.
- 170 Wesierska-Gadek J, Hoheneuer H, Hitchman E, Penner E. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis preferentially react with the amino-terminal domain of nuclear pore complex glycoprotein gp210. *J Exp Med* 1995; 182: 1159-1162.
- 171 Nickowitz RE, Worman HJ. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a restricted region within the cytoplasmic tail of nuclear pore membrane glycoprotein gp210. *J Exp Med* 1993; 178: 2237-2242.
- 172 Wesierska-Gadek J, Hoheneuer H, Hitchman E, Penner E. Anti- gp210 antibodies in sera of patients with primary biliary cirrhosis. Identification of a 64kD fragment of gp210 as a major epitope. *Hum Antibodies Hybridomas* 1996; 7: 167-174.
- 173 Itoh S, Ichida T, Yoshida T, Hayakawa A, Uchida M, Tashiro-Itoh T, et al. Autoantibodies against a 210 kDa glycoprotein of the nuclear pore complex as a prognostic marker in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 257-265.
- 174 Nickowitz RE, Wozniak RW, Schaffner F, Worman HJ. Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 106: 193-199.
- 175 Bandin O, Courvalin JC, Poupon, R, Dubel L, Homberg JC, Johanet C. Specificity and sensitivity of gp210 autoantibodies detected using an enzyme-linked immunosorbent assay and a synthetic polypeptide in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1996; 23: 1020-1024.
- 176 Konstantinov K, Foisner R, Byrd D, Liu FT, Tsai WM, Wiik A, et al. Integral membrane protein associated with the nuclear lamina are a novel autoimmune antigens of the nuclear envelope. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74: 89-99.
- 177 Wesierska-Gadek J, Hoheneuer H, Hitchman E, Penner E. Antibodies against nucleoporin p62 constitute a novel marker of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1996; 110: 840-847.
- 178 Miyachi K, Shibata M, Onozuka Y, Kikuchi F, Imai N, Horigome T. Primary biliary cirrhosis sera recognize not only gp210 but also proteins of the p62 complex bearing N-acetylglucosamine residues from rat liver nuclear envelope. *Mol Biol Rep* 1996; 23: 227-234.
- 179 Courvalin JC, Lassoued K, Worman HJ, Blobel G. Identification and characterization of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 1990; 172: 961-967.
- 180 Brito J, Biamonti G, Caporali R, Montecucco C. Autoantibodies to human nuclear lamin B2 protein. Epitope specificity in different autoimmune diseases. *J Immunol* 1994; 153: 2268-2277.
- 181 Vasquez JJ, Dixon FJ. Immunohistochemical study of lesions in rheumatic fever, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1957; 6: 205-217.
- 182 Kaplan MH, Vaughan JH. Reaction of rheumatoid sera with synovial tissue as revealed by fluorescent antibody studies. *Arthritis Rheum* 1959; 2: 356-362.
- 183 Kaplan MH. The fluorescent antibody technic as a research tool in the study of connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 1959; 2: 568-573.
- 184 Wise LJ, Shames JM, Derbes VJ, Hunter EM. Fluorescent antibody studies in chronic dermatitis. *Arch Derm* 1961; 84: 37-40.
- 185 Burnham TK, Neblett TR, Fine G. The application of the fluorescent antibody technique to the investigation of lupus erythematosus and various dermatosis. *J Invest Dermat* 1963; 41: 451-456.
- 186 Cormane RH. Bound globulin in the skin of patients with chronic discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1964; 1: 534-535.

- 187 Kalsbeek GL, Cormane RH. Bound complement in the skin of patients with chronic discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1964; 2: 178-80.
- 188 Tan EM, Kunkel HG. An immunofluorescent study of the skin lesions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1966; 9: 37-46.
- 189 Kofler D, Schur PH, Kunkel PH. Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1967; 126: 607-624.
- 190 Stollar DL, Levine L, Marmur J. Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in Lupus erythematosus serum. II. Characterization of antibodies in several sera. *Biochim Biophys Acta* 1962; 61: 7-18.
- 191 Stollar DL, Levine L, Lehrer H, Van Vunakis H. Antigenic determinants of denatured DNA reactive with lupus erythematosus serum. *Proc Nat Acad Sci USA* 1962; 48: 874-880.
- 192 Stollar DL, Levine L. Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in lupus erythematosus serum. IV evidence for purine determinants in DNA. *Arch. Biochem* 1963; 101: 417-422.
- 193 Stollar DL, Levine L. The reaction between lupus erythematosus serum and denatured deoxyribonucleic acid: Inhibition by haptens and chloroquine. (Abstr). *Arthritis Rheum* 1962; 5: 660.
- 194 Stollar DL, Levine L. Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in Lupus erythematosus serum. *J Immunol* 1961; 87: 477-484.
- 195 Aarden LA, De Groot ER, Feltkamp TEW. Crithidia lucillae a simple substrate for determination of anti-dsDNA with the immunofluorescent technique. *Ann NY Acad Sci* 1975; 254: 505-15.
- 196 Herrera-Esparza R, Avalos-Diaz E, Moreno-Rodríguez J. *Biología de los anticuerpos antinucleares serie científica y tecnológica*. DGIP-UAZ primera edición 1997: 7-8.
- 197 Arana R, Seligmann M. Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1967; 46: 1867-1882.
- 198 Rothfield NF, Stollar DL. The relation of immunoglobulin class, pattern of anti-nuclear antibody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1967; 46: 1785-1794.
- 199 Tojo T, Friou GJ. Lupus nephritis: varying complement-fixing properties of immunoglobulin G antibodies to antigens of cell nuclei. *Science* 1998; 161: 904-906.
- 200 Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl Med* 1968; 278: 533-538.
- 201 Stollar DL. Molecular analysis of anti-DNA antibodies. *Faseb J* 1994; 8: 37-42.
- 202 Kalsi JK, Martin AC, Hirabayashi Y, et al. Functional and modeling studies of the binding of human monoclonal anti-DNA autoantibodies. *Eur J Immunol* 1996; 33: 471-483.
- 203 Hermann M, Winkler TH, Fehr H, Kalden JR. Preferential recognition of specific DNA motifs anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1897-1904.
- 204 Hann BH. Antibodies to DNA. *New Engl J Med* 1998; 338: 1359-1368.
- 205 Seligmann M. Sérologie- mise en évidence le sérum des malades atteints de lupus érythémateux disséminé d'une substance déterminant une réaction de précipitation avec l'acide désoxyribonucléique. *Compt Rend Acad Sci (Paris)* 1957; 245: 243-245.
- 206 Levine L, Stollar DL. Nucleic acid immune systems. *Progr Allergy* 1968; 12: 161-191.
- 207 Farr RS. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I*BSA and antibody. *J Infect Dis* 1958; 103: 239-262.
- 208 Wold RT, Young FE, Tan EM, Farr RS. Deoxyribonucleic acid antibody. A method to quantify its primary interaction with deoxyribonucleic acid. *Science* 1968; 161: 806-807.
- 209 Pincus T, Schur PH, Talal N. A diagnostic test for systemic lupus erythematosus using a DNA binding assay. *Arthritis Rheum* 1968; 11: 873.
- 210 Pincus T, Schur PH, Rose JA, decker JL, Talal N. Measurement of serum DNA- binding activity in systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* 1969; 281: 701-706.
- 211 Iglesias-Gamarra A, Peña Cortés M, Restrepo Suárez JF. *Historia de la reumatología en Colombia*. Editores Philippe Chalem, Carlo V Caballero, Luis Fernando Prieto. Exlibris Editores SA 2001; pp: 24.
- 212 Tan EM. The L. E. and its legacy. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 625-658.
- 213 Tan EM, Carr RI, Schur PH, kunkel HG. DNA and antibody to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966; 45: 1732-1740.
- 214 Alarcón -Segovia D, Ruiz Argüelles A, Fishbein E. Antibodies to nuclear ribonucleoprotein penetrates live in human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 1978; 271: 67-69.
- 215 Schett G, Steiner G, Smolen JS. Nuclear antigen histone H1 is primarily involved in lupus erythematosus cell formation. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1446-1456.
- 216 Lerner MR, Boyle JA, Hardin JA, Steitz JA. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 1981; 211: 400-402.
- 217 Rinke J, Steitz JA. Precursor molecules of both human 5S ribosomal and transfer RNA are bound by a cellular protein reactive with anti-La antibodies. *Cell* 1982; 29: 149-159.
- 218 Von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of the systemic rheumatic diseases. *Sem Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358.
- 219 Mattioli M, Reichlin M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1974; 17: 421-429.
- 220 Alspaugh MA, Tan EM. Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 1975; 55: 1067-1073.
- 221 Chambers JC, Keene JD. Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus la antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5495-5497.
- 222 Tan EM. The L. E. and its legacy. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 625-658.