



11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACION DE LA ASOCIACION DE
ANTIGENOS DEL EXTRACTO TOTAL DE
CELULAS Hep-2 EN ENFERMEDADES
REUMATICAS AUTOINMUNES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
BIOMEDICAS EN INMUNOLOGIA**

P R E S E N T A L A:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

NORMA ROSSET, CAPIN GUTIERREZ

MEXICO, D.F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado constituido por los siguientes Sinodales:

Presidente: DR. RAUL MANCILLA JIMENEZ

Secretario: DR. EDMUNDO LAMOYI VELAZQUEZ

Primer Vocal: DR. CARLOS LAVALLE MONTALVO

Supiente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Suplente: DRA. BERTHA ESPINOSA GUTIERREZ

Sustentante: Q.F.B. NORMA ROSSET CAPIN GUTIERREZ

Tutor Principal: DR. LIBARDO ORTIZ-ORTIZ

Cotutor: DR. CARLOS LAVALLE MONTALVO

A GRADECIMIENTOS:

A mis padres por contribuir en mi formación.

A mis hijos y esposo por su estímulo.

A mi hermana por su apoyo profesinal.

A mis tutores por su confianza, orientación y paciencia en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por encausarme en la elaboración del presente manuscrito.

A Pelita por su buena disposición.

A mis amigos por alentarme en todo momento.

A mis compañeros por impulsar mi superación.

I N D I C E :

	PAG.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2-13
2.1. AUTOINMUNIDAD.	2
2.1.1. Autoanticuerpos naturales.	3
2.1.2. Autoanticuerpos patogénicos y factores desencadenantes.	4-5
2.1.3. Autoanticuerpos marcadores de enfermedad.	6-7
2.1.4. Metodologías actuales para la detección de autoanticuerpos marcadores de enfermedad y sus limitaciones.	8-13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14-15
4. OBJETIVOS	16
4.1. OBJETIVO GENERAL.	
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	
5. MATERIAL Y METODOS	17-23
5.1. OBTENCION DEL EXTRACTO TOTAL DE CELULAS Hep-2.	17
5.2. SUEROS.	18
5.3. INMUNELECTROTRANSFERENCIA DEL EXTRACTO TOTAL DE CELULAS Hep-2.	19-21
5.4. OBTENCION DE LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPLASMATICA DE LAS CELULAS Hep-2.	21-22
5.5. ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPLASMATICA DE LAS CELULAS Hep-2.	22
5.6. ANALISIS POR IMMUNOPLOT.	23

6. RESULTADOS	24-48
6.1. PATRONES DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE PACIENTES CON ENFERMEDADES REUMATICAS AUTOINMUNES Y CONTROLES SANOS.	24-25
6.2. DETERMINACION DE LA MASA RELATIVA Y ENUMERACION DE LAS BANDAS ANTIGENICAS.	26-30
6.3. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR LOS SUEROS DE PACIENTES Y DE SUJETOS SANOS.	31-32
6.4. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR LOS SUEROS DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO Y DE INDIVIDUOS SANOS.	33-34
6.5. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y DE INDIVIDUOS SANOS.	35-36
6.6. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO Y DE SUJETOS SANOS.	37-38
6.7. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTEMICA PROGRESIVA Y DE INDIVIDUOS SANOS.	39-40
6.8. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON POLIMIOSITIS Y DERMATOMIOSITIS Y DE INDIVIDUOS SANOS.	41-42
6.9. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON SINDROME DE SOBREPOSICION Y DE INDIVIDUOS SANOS.	43-44
6.10. ANALISIS FACTORIAL ENTRE PACIENTES CON ENFERMEDAD REUMATICA AUTOINMUNE Y SUJETOS SANOS EN LAS TRES REGIONES DE LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.	45-46
6.11. IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPASMICA DE CELULAS HEp-2.	47-48
7. DISCUSION	49-54
8. CONCLUSIONES	55-56
9. ABBREVIATURAS	57-58

10. BIBLIOGRAFIA

59-72

- 11. PUBLICACION:** Capin N., Lavalle C., Ortiz-Ortiz L.: Antigen Association of total HEP-2 Extract in the Screening of Autoimmune Diseases by Western Blot. J. Clin. Lab. Anal. 10:140-143, 1996.

73-76

1

R E S U M E N

Mediante un extracto total de células HEp-2 (ETC HEp-2) y el método gráfico de inmunoplot se realizó el análisis de los patrones de inmunoelectrotransferencia (IET) obtenidos con sueros de 120 pacientes con diversas enfermedades reumáticas autoinmunes (ERRI): 85 con lupus eritematoso sistémico (LES), 5 con artritis reumatoide (AR), 5 con esclerosis sistémica progresiva (ESP), 10 con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), 5 con dermatomiositis y/o polimiositis (DM/PM) y 10 con síndrome de sobreposición (SSp); como control se usaron 40 sueros de individuos sanos.

Se encontró que 99% de los sueros de pacientes, incluso aquellos reportados como seronegativos por otros métodos de detección de anticuerpos antinucleares, reaccionaron con bandas antigénicas en la región comprendida entre 14 y 20 kilodaltones (kDa), mientras que sólo el suero de uno de los individuos sanos, reaccionó con una sola banda de esa región. Se propone que la reactividad hacia estos antígenos sea empleada en pruebas tamiz para el estudio de sujetos con sospecha de ERRI, en especial para LES. El análisis de inmunoplot de los patrones de inmunoblot mostró que no pueden utilizarse, estos antígenos, para hacer caracterizaciones de algún tipo de ERRI en particular.

Se investigó por electroforesis el origen de los antígenos detectados en la región entre 14 y 20 kDa, utilizando las fracciones protéicas tanto nucleares como citoplasmáticas de células HEp-2, demostrándose que se trataba de antígenos de origen nuclear.

2 INTRODUCCION

Se han llamado enfermedades autoinmunes a padecimientos donde se demuestran autoanticuerpos o linfocitos capaces de reaccionar contra componentes moleculares o celulares propios. Sin embargo, la sola presencia de autoanticuerpos en estas enfermedades no necesariamente implica que los autoanticuerpos tengan gran importancia como agentes patogénicos primarios (1).

2.1. AUTOINMUNIDAD.

El concepto de fenómeno autoinmune, ha recibido diferentes interpretaciones. Inicialmente se le concibió como *horror autotóxico*, para referirse a que en estado normal el organismo no puede llevar a cabo una respuesta inmunitaria contra lo propio pero si ésta ocurre, la respuesta daña al organismo (2). Posteriormente se habló de la liberación de clonas prohibidas producidas por mutación en las células linfoides, provocando el reconocimiento de los antígenos propios normales (3). Estos dos conceptos se encaminan hacia el rompimiento de la tolerancia a lo propio. En la actualidad, por los avances de la biología molecular y de la genética estos conceptos han cambiado, considerando al fenómeno autoinmune como un evento natural multifactorial, resultante de cambios producidos durante la vida, con gran variabilidad entre individuos, aún bajo condiciones genéticas y

ambientales idénticas (4). Este concepto implica que los autoanticuerpos no son necesariamente patogénicos, sino que pueden ser un fenómeno natural benéfico, con función reguladora dentro de la red inmunitaria.

Se considera que el rompimiento del estado de homeostásis por alteración de factores ya sean genéticos (5,6), infecciosos (7), hormonales (8-10) o psiconeuroinmunológicos, conlleva al establecimiento de la enfermedad autoinmune, por una alteración grave de la red inmunitaria (11). Ejemplo de alteración genética es la ausencia experimental del gen productor del receptor β de IL-2 (IL-2R) en ratones, que tiene un papel inmunomodulador, lo que induce la activación de linfocitos T y la proliferación de linfocitos B, con secreción de altas concentraciones de IgG1 e IgE, la producción de autoanticuerpos y la aparición de enfermedad autoinmune (12).

2.1.1. Autoanticuerpos naturales.

En individuos sanos, se producen autoanticuerpos "*naturales*" dirigidos hacia antígenos propios, los cuales por ser principalmente de clase IgM, en baja concentración y con baja afinidad por el antígeno, contribuyen a mantener el equilibrio en el reconocimiento de componentes propios mediante la red antidiotípica (13); ejemplo de esto es la producción autóloga de anticuerpos idiotípicos (anti-F(ab')₂) dirigidos contra el anti-DNA, capaces de bloquear la unión del

anti DNA a su sustrato homólogo de DNA, lo que se correlaciona con LES en remisión; la disminución de este anti-F(ab')₂, se traduce en LES activo (14). La autoinmunidad como fenómeno natural, se interpreta como la formación de la imagen en espejo de los antígenos propios, a través de su reconocimiento por autoanticuerpos de relativa baja afinidad o avidez (15). Se han encontrado autoanticuerpos naturales contra componentes intracelulares, de membrana y contra proteínas circulantes (16). Aproximadamente el 50 % de las inmunoglobulinas séricas son reactivas hacia antígenos propios (17). La concentración en el suero de autoanticuerpos naturales es 20% más elevada en mujeres que en hombres.

2.1.2. Autoanticuerpos patogénicos y factores desencadenantes.

Componentes propios como proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, lipoproteínas, azúcares o esteroides, pueden llegar a ser el blanco de una respuesta autoinmune patogénica, por medio de diferentes mecanismos, como son: la exposición de autoantígenos anatómicamente secuestrados (18); la expresión de determinantes de neo-antígenos propios o de epítopos propios subdominantes, que por haber estado fuera del umbral antigénico no habían sido reconocidos como propios (19); la activación de células T a través de antígenos propios que por su baja expresión o su inadecuada presentación, habían permanecido ignorados; por reactividad cruzada, con

antígenos exógenos como los retrovirus y la enterotoxina de estafilococo <superantígenos> (20, 21) que por identidad parcial, sea molecular o estructural de componentes propios, presentan suficiente diferencia para romper la tolerancia a lo propio; además los virus pueden incorporar tanto en su membrana como en la cápside antígenos existentes en la célula del huésped, los cuales pueden ser reconocidos en un contexto inmunológico diferente dando como resultado una respuesta contra lo propio (22). Todos estos antígenos poseen un potente efecto estimulante sobre la proliferación polyclonal de linfocitos B y T CD4+, en particular de la subpoblación Th2, con la consecuente secreción de IL-4 e IL-5, producción de células plasmáticas y formación de autoanticuerpos de alta afinidad (23). Los linfocitos Th2 también liberan IL-6 que tiene entre sus funciones biológicas, el inducir diferenciación de células B, ser potente coestimuladora de células T, además de proveer la señal para la producción de IL-2, que a su vez es responsable de la activación de células T (24). La IL-1 y los receptores B7/CD8 interactúan para regular la producción de IL-6 en células T humanas (25). La presencia continua de autoantígenos, favorece que la respuesta autoinmune se mantenga en forma constante (26-28). El desequilibrio de la respuesta celular y/o humoral puede producir daño y destrucción de tejidos propios, lo que da como resultado enfermedad autoinmune (29).

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra una gran variedad de antígenos

sean nucleares y/o citoplasmáticos e incluso proteínas solubles del suero. De acuerdo con la especificidad de los autoanticuerpos, las enfermedades autoinmunes se consideran "*organoespecíficas*", cuando los autoanticuerpos están dirigidos hacia antígenos exclusivos de un órgano en particular, como en la miastenia gravis, en donde se producen autoanticuerpos contra el receptor de acetil colina y "*sistémicas o generalizadas*", si los autoanticuerpos están dirigidos hacia autoantígenos que forman parte de diferente material celular, como pueden ser el DNA, RNP, Ro, La, Scl-70, Sm, histonas o hacia antígenos circulantes como el autoanticuerpo dirigido contra la región constante de la cadena H de la IgG, conocido como Factor Reumatoide (30-32).

2.1.3. Autoanticuerpos marcadores de enfermedad.

Se considera que la gran variedad de autoanticuerpos presentes durante el desarrollo de las diferentes ERRI son consecuencia y no causa del padecimiento(33); una evidencia al respecto, es el reporte en relación a la proteína de choque térmico (HSP) liberada en estados de estrés en las enfermedades reumáticas y padecimientos neuropsiquiátricos autoinmunes. Se ha encontrado también la producción de anti-HSP, en pacientes con lupus eritematoso sistémico (34,35). Los autoanticuerpos son considerados como marcadores de enfermedad por guardar relación con la actividad de la enfermedad,

localizarse en el área del tejido dañado, ser en la mayoría de las veces inmunoglobulinas de clase IgG con alta especificidad y afinidad por su ligando y encontrarse en grandes concentraciones en el suero (36). En ocasiones, sin embargo, ha sido la IgM la que ha mostrado ser el autoanticuerpo de alta afinidad, que exacerba la enfermedad, y la IgG el autoanticuerpo natural de baja afinidad. De acuerdo a lo anterior, se puede resumir que tanto la concentración de los autoanticuerpos y su afinidad, así como el tipo de respuesta, sea primaria o secundaria, juegan un papel importante en la presencia de la enfermedad.

Los autoanticuerpos como marcadores de enfermedad, han permitido diagnosticar con mayor precisión, algunas de las enfermedades autoinmunes, gracias al empleo de antígenos nucleares y citoplasmáticos purificados, como: el anti-DNA y anti-Sm en lupus eritematoso sistémico (37,38), anti-Ro y anti-La en el síndrome de Sjögren (39), anti-RNP en enfermedad mixta del tejido conectivo (40), anti Scl-70 en escleroderma, anti CR-19 en CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, escleroderma y telangiectasia) (41) y otros; sin embargo, estos autoanticuerpos no se manifiestan en todos los casos, ya que pueden estar ausentes en presencia de enfermedad (42).

2.1.4. Metodologías actuales en la detección de autoanticuerpos marcadores de enfermedad y sus limitaciones.

El método más utilizado para detectar autoanticuerpos en diversas ERAI ha sido la determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta (RAN-IFI), implementada desde 1950, donde se emplean diferentes tipos de sustratos antigénicos, de entre los cuales la línea celular HEP-2 ha resultado ser la de mayor sensibilidad y especificidad(43,44), que desde 1980, ha permitido detectar una gama muy amplia de autoanticuerpos, a manera de patrones de inmunofluorescencia característicos, como son los patrones: periférico o anular, el homogéneo, el anti-centrómero o moteado discreto, el moteado fino, algunos patrones citoplasmáticos como el anti-mitocondrial y el anti-músculo liso (fig.1). La correlación de estos patrones con los datos clínicos de cada uno de los diferentes padecimientos, proporciona una herramienta importante para establecer el diagnóstico de algunas ERAI, como lo es el patrón periférico con LES y el patrón anti-centrómero con escleroderma (45,46). Sin embargo, este método no permite identificar de manera específica a los autoantígenos involucrados en el padecimiento.

La mayoría de los métodos empleados actualmente en el laboratorio clínico, pueden identificar específicamente los autoanticuerpos dirigidos hacia autoantígenos que han sido parcialmente purificados, como los antígenos extraídos de los

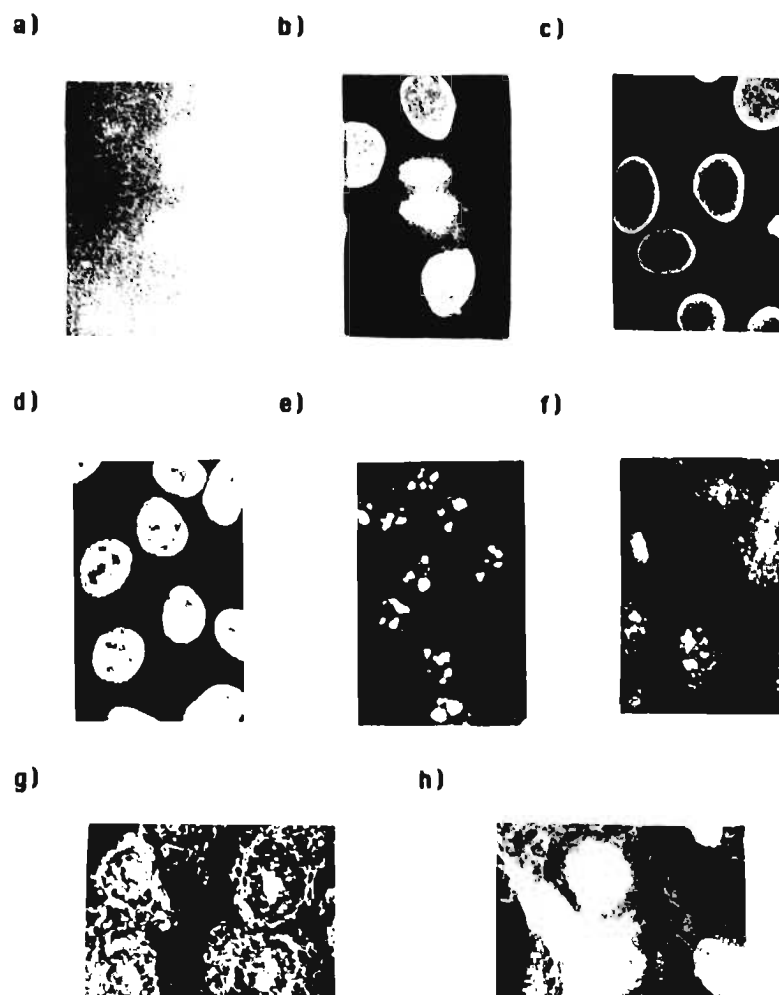


Fig. 1. Patrones de ARN-IFI: a)Control negativo, b)Homogéneo, c)Periférico, d)Moteado fino, e)Nucleolar, f)Centrómico, g)Mitocondrial, h)Músculo liso. 1000x (Behring).

núcleos del timo de ternera (ENA) utilizados en la doble difusión en agar, o a múltiples antígenos purificados como los nucleares, algunos de ellos obtenidos por cDNA, empleados en pruebas de ELISA e Inmunodot (47-49). Aunque estas metodologías poseen una alta sensibilidad y especificidad, la ayuda diagnóstica que proporcionan es limitada, ya que en algunas ocasiones, los autoanticuerpos relevantes del padecimiento pueden estar dirigidos contra epítomos ausentes en los antígenos purificados, lo que hace imposible su detección.

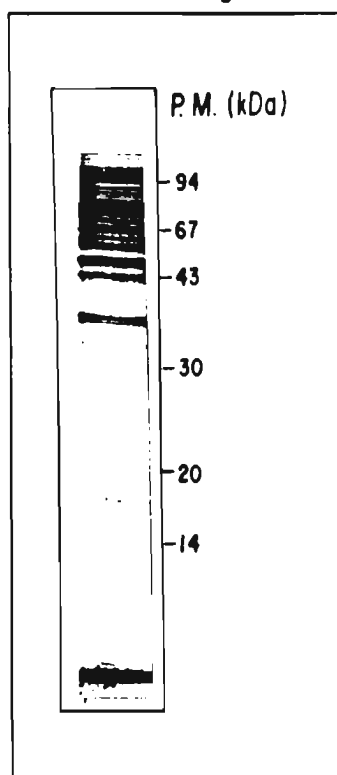
El método que ha mostrado una sensibilidad mayor que la prueba de ARN-IFI, es la inmunoelectrotransferencia (IET), con la ventaja de que los antígenos son identificados por su diferente peso molecular. Desde la década de los ochenta, diversos investigadores han realizado esta prueba en estudios de investigación clínica con el objeto de identificar y caracterizar los autoanticuerpos formados en las diversas enfermedades del tejido conectivo, empleando diferentes sustratos, entre los cuales el más utilizado ha sido la línea celular HeLa-S3 proveniente de carcinoma cérvico uterino humano; sin embargo, la mayor parte de los estudios se han realizado con antígenos semipurificados o utilizando por separado la fracción nuclear y citoplasmática, detectando algunos de los autoantígenos en forma individual (50, 51), como Van Venrooij y col. (52), quienes emplearon autoanticuerpos específicos y encontraron los autoantígenos Sm con una masa relativa (Mr) de 28 y 29 kDa, el Ro (SS-A) de 60 kDa y La (SS-B) de 47 kDa, Scl-70, CR-19, U1-RNP de 68 kDa. Una limitante en la identificación de algunos autoantígenos es la

similaridad en sus Mr, lo cual ya fue demostrado por Elkon y col. (53) por electroforésis de doble dimensión en gel de poli(acrilamida). En 1988 Rooij y col. (54), encontraron asociaciones no esperadas entre los autoanticuerpos y los padecimientos autoinmunes, como por ejemplo, el anticuerpo anti-Sm con polimiositis o bien, asociación de autoanticuerpos con manifestaciones aisladas de enfermedad, como el anti-Ro (SSA) y anti-La (SSB) con leucopenia. Estos hallazgos confirman que la detección de un solo autoanticuerpo no es concluyente para establecer el diagnóstico de una enfermedad autoinmune, ya que pueden encontrarse los mismos autoanticuerpos en diferentes padecimientos. Kallenberg y col. (55) realizaron estudios longitudinales de los autoanticuerpos en pacientes con ERAI hacia antígenos conocidos por IET, y sugirieron que éstos pueden ser de ayuda diagnóstica y pronóstica, ya que observaron en pacientes con Raynaud primario (padecimiento que involucra afección microvascular) autoanticuerpos hacia antígenos Sm, RNP, SS-A, SS-B, SCL-86, CR-19; estos pacientes desarrollaron posteriormente enfermedades del tejido conectivo, lo que pone de manifiesto el valor predictivo de los RAN detectados por inmunoblot con células HeLa-S3. Además en pacientes con LES se observan cambios en los patrones de autoanticuerpos durante la evolución de la enfermedad, con aparición de Sm y desaparición de otras bandas, lo cual demuestra que los patrones no son inmutables (56).

Tomando en cuenta la importancia que ha tenido en la clínica la correlación de los patrones de IFI para determinar RAN con células

HEp-2, y ya que éstas y las células HeLa-S3 presentan características antigénicas muy semejantes (22), en nuestro laboratorio hemos empleado el extracto total de células HEp-2 (ETC HEp-2) para la IET, la cual muestra antígenos nucleares y citoplasmáticos tanto solubles como insoluble (57), que pueden evidenciarse al teñirlos con tinta India (58) en la membrana de nitrocelulosa sobre la cual fueron transferidos; encontrándose cerca de 50 bandas de proteínas con pesos moleculares que oscilaron de 14 a más de 94 kDa (Fig.2). Esto

Fig. 2. Electrotransferencia del PAGE-SDS del ETC HEp-2 en papel de nitrocelulosa teñido con tinta India.



permitió detectar la mayor cantidad posible por inmunoblot de

autoanticuerpos. El análisis comparativo entre el método de RAN-IFI y la IET, demostró que no existe correlación entre ambos métodos, ya que un mismo patrón de RAN-IFI puede corresponder a diversos patrones de IET. Lo anterior indica que los patrones de RAN-IFI no son específicos hacia un tipo de autoanticuerpos y por tanto no brindan información respecto a cuales autoanticuerpos están presentes en los sueros de pacientes con diversas ERAI.

La ventaja que muestra la IET sobre la IFI es que permite identificar con precisión, la fracción antigénica a la que están dirigidos los autoanticuerpos y define además patrones de Inmunoblot específicos para cada paciente en particular, mismos que pueden ser de utilidad para orientar el diagnóstico clínico. Entre los inconvenientes que se observan al realizar la IET, es la presencia de autoanticuerpos en los sueros de sujetos sanos, por arriba de 50 kDa que puedan ser de importancia diagnóstica en los pacientes. Estos anticuerpos pueden corresponder a los autoanticuerpos naturales ya descritos por otros autores (59-60). Todos estos resultados resaltan la necesidad de conocer las asociaciones entre los diferentes autoanticuerpos obtenidos por IET con ETC HEp-2 y las diversas ERAI, que pudieran servir como ayuda diagnóstica, pronóstica y/o terapéutica.

3 *p*LANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de las ERAI se ha apoyado en pruebas de laboratorio, tales como la detección de anticuerpos antinucleares por RAN-IFI empleando como sustrato células HEp-2. Este ha sido el método de más utilidad y confiabilidad para detectar la presencia de autoanticuerpos, a manera de patrones de inmunofluorescencia característicos, que se han correlacionado con las diversas ERAI, por lo que se les ha considerado de utilidad diagnóstica; sin embargo, su interpretación queda sujeta a la experiencia y criterio del operador, por lo que se le considera un método subjetivo, además de que los patrones de inmunofluorescencia no permiten identificar los autoantígenos involucrados en el padecimiento. Por lo anterior se han desarrollado otras técnicas que utilizan antígenos purificados, con objeto de obtener reactividad sólo hacia los autoanticuerpos específicos. Desafortunadamente esto impide que sean identificados otros autoanticuerpos que pudieran ser importantes como marcadores de enfermedad, por lo tanto estos métodos no ofrecen gran ayuda diagnóstica. En consecuencia y tomando en cuenta un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, en un grupo de pacientes donde se comparó el método de IET con un extracto total de células HEp-2 como sustrato, con el de RAN-IFI, se encontró que no hubo correlación entre ambos métodos, con respecto al tipo de autoanticuerpos encontrados, pero sí hubo asociación con la enfermedad (57). En el presente estudio se pretende por medio del

análisis de Inmunoplot de los patrones de IET, caracterizar los autoantígenos y determinar los autoanticuerpos útiles, como marcadores de enfermedad reumática autoinmune. Esto nos permitirá determinar por estudios prospectivos su relación con las manifestaciones clínicas durante la evolución de las diferentes ERAI, y utilizar este conocimiento como apoyo diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

4 O B J E T I V O S

4.1. OBJETIVO GENERAL

-Identificar autoantígenos de importancia diagnóstica en enfermedades reumáticas de posible etiología autoinmune.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

-Obtener sueros de pacientes con ERAI y de individuos sanos.

-Realizar IET de los sueros utilizando como sustrato un extracto total de células HEp-2

-Caracterizar a los antígenos reactivos de acuerdo a sus masas relativas (Mr), y obtener su frecuencia de reactividad en pacientes y en individuos sanos.

-Comparar por inmunoplot los perfiles de reactividad antigénica de enfermos e individuos sanos.

-Definir el origen nuclear y citoplasmático de los antígenos reconocidos de las células HEp-2 .

5 MATERIAL Y METODOS

5.1. OBTENCION DEL ETC-HEP-2.

La clona de células HEp-2, proveniente de carcinoma laríngeo humano, fue proporcionada por el Laboratorio de Urología de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., donde se mantenía en nitrógeno líquido (-195 °C) contenida en viales con solución criopreservadora (glicerol 20%, suero fetal bovino <SFB> 30% en RPMI-1640) . Para expandir la clona, las células se descongelaron en baño maría a 45 °C y se cultivaron en medio de RPMI-1640 (GIBCO) pH 7.4, suplementado con 3% de SFB inactivado y 100 µg/ml de antibiótico-antimicótico (Sigma), incubados a 37 °C en ambiente de CO₂ al 5% en aire por 96 h, hasta obtener un 100% de confluencia. La monocapa se lavó con un amortiguador salino de fosfatos (PBS) 0.1M adicionado con EDTA al 0.02% pH 7.4; se desprendió de la botella de cultivo con 0.5 ml de una solución de tripsina-EDTA pH 7.4 (Sigma), se dejó 30 seg a temperatura ambiente, y se sacudió la placa para despegar la monocapa (61). Las células así obtenidas se centrifugaron a 400 g por 5 min y resuspendieron en el mínimo volumen de PBS-7.4 adicionado con 0.5 mM de fenil metil sulfonyl cloruro (PMSC). Después de lizar las células por congelación y descongelación, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry y col. (62), como se describe a continuación. A partir de una solución de albúmina

humana que contenía 100 µg/ml, se elaboró una curva de referencia con 100, 50, 25 y 12.5 µg de proteína/ml. El antígeno del ETC HEp-2, se diluyó 1:10, 1:50, 1:100 con NaOH 0.1N en volúmenes de 1 ml; a todos los tubos, incluidos los de la curva de referencia, se les añadió 3 ml de una solución compuesta por la mezcla de 10 Uol de carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N, 1 Uol de tartrato doble de sodio y potasio al 2%, y 1 Uol de CuSO₄ al 1% y se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 min; posteriormente se adicionó 0.3 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro (Carl Zeiss) a 750 nm de longitud de onda, las densidades ópticas (D.O) obtenidas de la curva de referencia se graficaron contra la concentración (µg/ml) correspondiente. El ETC-HEp-2 se ajustó a una concentración de 500 µg/ ml de proteína, en amortiguador Tris (Tris base 31 mM, glicina 47 mM y SDS 0.8 mM) pH 8.3, y se almacenó en alícuotas a -20 °C.

5.2. SUEROS.

Se obtuvieron 120 sueros de pacientes con diversas EARI del Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades Centro Médico la Raza del IMSS. De éstos, 85 sueros correspondieron a pacientes con LES, diagnosticados clínicamente de acuerdo a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR)

(63); 10 fueron clasificados como EMTC (64), 5 como RR (65); 5 como ESP, (66); 5 como DM/PM (67,68) y 10 como SSp (69). Se incluyeron como controles 40 sueros de sujetos clínicamente sanos. El diagnóstico clínico en todos los casos, se apoyó en pruebas de laboratorio, como la IFI sobre un sustrato de células HEp-2 para la detección de anticuerpos antinucleares (43), la IFI sobre un sustrato de *Crithidia lucillae* para la búsqueda de autoanticuerpos Anti-nDNA (70) y la cuantificación nefelométrica de las fracciones séricas C3 y C4 del complemento (nefelómetro-láser de Behring).

5.3. IET DEL ETC-HEp-2.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), se realizó de acuerdo al método discontinuo de Laemmli (71), para lo cual se emplearon placas verticales de 18 X 16 cm y 1.5 mm de espesor. El gel separador (inferior) se preparó al 12.5%, empleando 41.7% de stock de acrilamida al 30%; 16.7% de stock de bis-acrilamida al 2%; 37.5% de Tris base pH 8.8 1 M; 0.5% de stock de SDS al 20%; 3% de agua desionizada; 0.3% de stock de persulfato de amonio (APS) al 10%. La mezcla se degasificó con vacío y agitación por 5 min y se añadió 0.05% de N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (TEMED). El gel concentrador (superior) fue preparado al 3.75% con 16% del stock de acrilamida al 30%; 6.7% del stock de bis-acrilamida al 2%; 11.84% de tris base 1 M pH 6.8 ; 0.5%

del stock de SDS al 20%; 64.4% de agua desionizada; 0.47% del stock de APS al 10%, la mezcla se desgasificó durante 5 min al vacío con agitación y se añadió 0.1% de TEMED. El ETC-HEp-2, se diluyó 1:2 en el amortiguador de muestra (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, glicerol al 25% <Vol/Vol>, SDS al 2%, prionina "Y" <Bio-Rad> al 0.02%), con β -mercaptoetanol al 5%, se sometió a ebullición durante 5 min, y se aplicó en toda la canal a una concentración final de 250 μ g/ ml. Se emplearon marcadores de bajo peso molecular (fosforilasa b, 94,000 Da; albúmina sérica bovina <BSA>, 67,000 Da; ovoalbúmina, 43,000 Da; anhidrasa carbónica, 38,000 Da; Inhibidor de tripsina, 20,000 Da y lactoalbúmina, 14,400 Da, Pharmacia). El corrimiento electroforético se realizó en amortiguador de Tris (Tris base 25mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%, pH8.3), a 20 mA y corriente constante por 30 min para el gel superior y 40 mA por 3 h para el gel inferior. Para evidenciar las bandas proteicas, una parte del gel se tiñó con azul de Coomassie (72), y el resto se utilizó para realizar la electrotransferencia, de acuerdo a el método de Towbin y col. (73). Las proteínas del ETC HEp-2 separadas por PAGE-SDS, fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micrones (Bio-Rad) en amortiguador de transferencia (Trisma-base 0.025M, glicina 0.192M, metanol 20%, pH=8.3), a 24 V y voltaje constante durante 2 h. Para comprobar la transferencia, parte de la membrana se tiñó con tinta India diluida 1:40 en PBS pH 7.2, por 1 h; el resto de la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de PBS-tween 20 (0.05%) - BSA (3%), pH 7.2 y se incubó por 1 h a 37 °C. Las membranas se conservaron en

seco a -20 °C.

Para realizar el inmunoblot, los sueros tanto de pacientes como de individuos sanos se diluyeron 1:750 en amortiguador para muestra [PBS-tween 20 (0.3%) - BSA (0.1%), pH7.4]. Sobre las tiras de nitrocelulosa que contenían las diferentes fracciones antigénicas del ETC HEp-2, se aplicaron por separado con cada uno de los sueros diluidos por triplicado e incubaron durante 18 h a 4 °C. Las tiras se lavaron con PBS-tween 20 (0.3%), pH 7.4. Posteriormente se adicionó como segundo anticuerpo un anti-gama humana (IgG+IgA+IgM) obtenido en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano (Zimed), diluido 1:2000, el cual se incubó por 2 h a 37 °C. La reacción se reveló con 4-cloro 1-naftol (Sigma) y perhidrol (Merck). La Mr de los antígenos de interés se calculó por el análisis de regresión lineal, para lo cual primero se obtuvieron los factores de referencia (Rf) por medio de la relación de la distancia de migración del antígeno, entre la distancia de migración del frente del colorante, los cuales se graficaron contra el logaritmo de la Mr del peso molecular de referencia correspondiente.

5.4.OBTENCION DE LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPLASMATICA DE LAS CELULAS HEp-2.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Hinterberger y col. (74), modificado por Westgeest (75). Las células HEp-2 cultivadas, se

cosecharon y lavaron, posteriormente se les adicionó amortiguador isotónico [KCl 90 mM, NaCl 10 mM, buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5, EDTA 1mM y Nonidet P-40 (0.5%) Uol/Uol, PMSC 1mM], seguido de la disgregación por su paso a través de una aguja de 1.2 x 40 mm. Se confirmó la lisis celular por observación microscópica de los núcleos liberados. El lisado se centrifugó en un gradiente de sacarosa [sacarosa 800 mM, KCl 25 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 (1%) Uol/Uol, fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF) 1 mM] por 15 min a 2000 g. El sobrenadante correspondió a la fracción citoplasmática y el sedimento a la fracción nuclear. Los núcleos se resuspendieron en solución de Tris (5ml de NaCl 110 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Tris 10mM pH 7.5, sacarosa 250 mM, PMSF 1 mM), y ambas fracciones se sometieron a congelación y descongelación, con objeto de que las fracciones protéicas tuvieran el mismo procesamiento que el del ETC-HEp-2 utilizado en la IET, para después por el método de Lowry y col. cuantificar y ajustar la concentración de proteína a 500 µg/ml.

5.5. ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA DE LAS CELULAS HEp-2.

La fracción nuclear y citoplasmática, así como el ETC-HEp-2, se corrieron por PAGE-SDS en mini geles de Bio-Rad. El gel separador (inferior) al 12.5%, y el gel concentrador (superior) al 3.75%. El ETC-

HEp-2, así como las fracciones nuclear y citopasmática se diluyeron 1:2 en el amortiguador de muestra en presencia de β -mercaptoetanol al 5%, se sometieron a ebullición por 5 min, y se aplicó en el gel cada antígeno a una concentración final de $2.5\mu\text{g}/10\mu\text{l}$; al mismo tiempo se ensayaron los marcadores de bajo peso molecular. El corrimiento electroforético se realizó en amortiguador de corrida Tris, pH8.3, con un voltaje constante de 150 V para dos geles, durante 1h; para evidenciar en los geles las diversas bandas proteicas se tiñeron con azul de Coomassie (72).

5.6. ANALISIS POR INMUNOBLOT.

En los gráficos de inmunoblot de frecuencias simples o frecuencias de reconocimiento (76) se comparó la frecuencia (%) de reactividad de los sueros de individuos enfermos con la de los sanos, que reaccionaron con cada una de las bandas del antígeno ETC HEp-2, determinados por su Mr, en las tres regiones que para fines de estudio se dividió el patrón de inmunoblot (107-50 kDa, 48-21 kDa y de 20-14 kDa).

6 **R**ESULTADOS

6.1. PATRONES DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE PACIENTES CON ENFERMEDADES REUMATICAS AUTOINMUNES Y CONTROLES SANOS.

Los patrones de IET, resultantes de la reactividad entre los sueros de los 120 pacientes con diversas EAAI y los antígenos presentes en el ETC-HEp-2, fueron muy diversos, mostrando diferencias en cuanto a número y localización de las bandas antigénicas (Fig.3-a). En promedio los sueros de los pacientes reaccionaron con unas 10 bandas.

El patrón de inmunoblot de los 40 sueros de individuos sanos, en su mayoría mostró reactividad con los antígenos de peso molecular superior a 50 kDa. Sin embargo, hubo muy poca reactividad por debajo de los 50 kDa, a excepción de un suero que mostró reconocimiento de un antígeno de 18.2 kDa (Fig.3-b, flecha). En promedio, los sueros controles reaccionaron con unas 3 bandas.

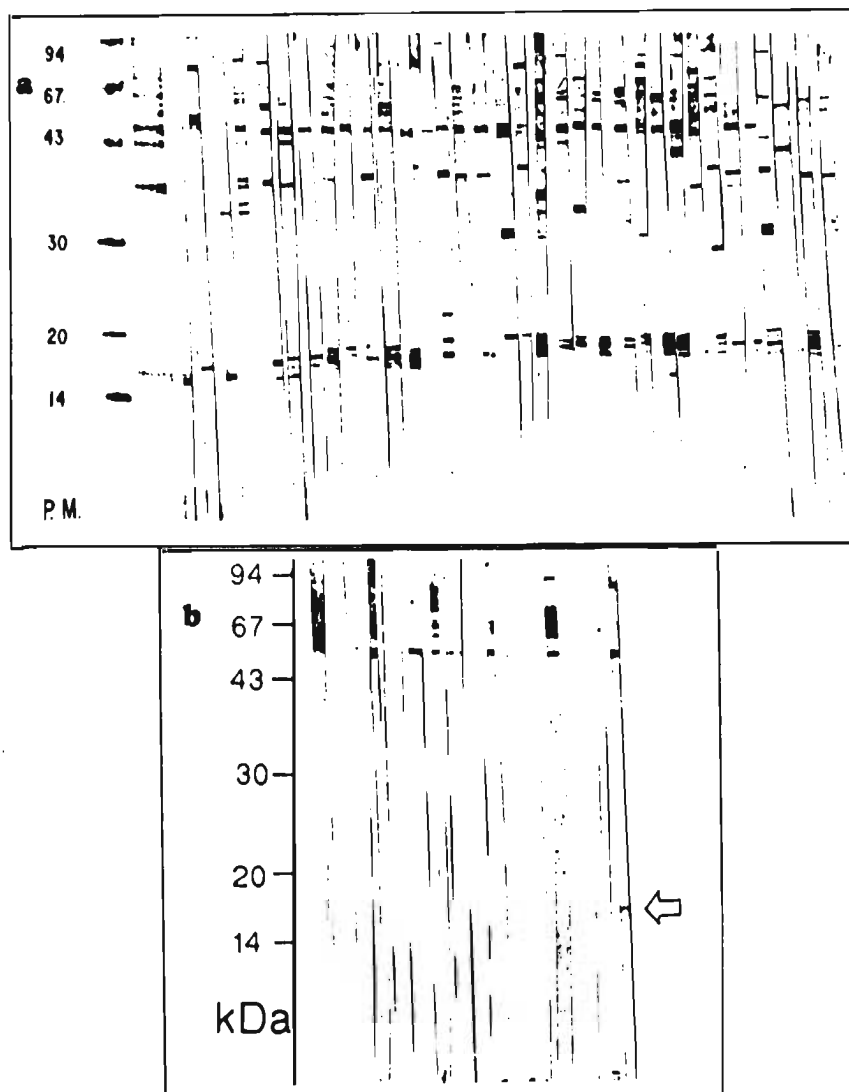


Fig. 3. a) Patrones de IET de los sueros de los pacientes con diferentes EARRI. b) Patrones de IET con sueros de sujetos sanos. (La flecha indica la M_r de 18.2 kDa).

6.2. DETERMINACION DE LA Mr Y ENUMERACION DE LAS BANDAS ANTIGENICAS.

Con el objeto de diferenciar en cada paciente la diversa reactividad de los distintos padecimientos, se dispusieron los antígenos en tres grupos conforme a su Mr. En primer lugar se analizaron las bandas antigénicas localizadas entre los 50 y 107 kDa (Tabla 1). En esta región se encontró en todos los casos estudiados, una amplia reactividad de autoanticuerpos, incluso en los sueros de los individuos sanos, con presencia de numerosas y variadas bandas que impidieron observar posibles antígenos de importancia diagnóstica. Es de hacer notar que la banda de 50 kDa dió una reactividad en 118/120 sueros de pacientes y en 37/48 sueros de sujetos normales.

En segundo lugar se investigaron las bandas antigénicas comprendidas entre 48 y 20 kDa (Tabla 2). La reactividad en esta zona mostró que los pacientes con LES presentaron mayor número de autoanticuerpos en comparación a las demás ERAI estudiadas; sin embargo, algunas de las enfermedades como el EMTC y el SSp mostraron algunas de estas bandas probablemente por su relación con LES. La banda de 37 kDa mostró una alta reactividad en 96/120 sueros de los pacientes y en 8/40 sueros de los individuos sanos.

En tercer lugar se estudiaron las bandas antigénicas con pesos moleculares entre 20 y 14 kDa (Tabla 3). Estos antígenos reaccionaron con la mayoría de los sueros de sujetos enfermos, y sólo en una

ocasión con uno de los sueros de los individuos sanos. El antígeno de 19.5 kDa permitió discriminar entre enfermos y sanos ya que fue reconocido por 99 de 120 sueros de enfermos y por ninguno de los 40 sueros controles. Resultados semejantes se observaron con el antígeno de 18.2 kDa, reconocido por 104 de 120 sueros de enfermos y por sólo un suero control.

En resumen, la región de 14-20 kDa, presenta la mayor especificidad ya que 119/120 pacientes y 1/40 individuos sanos mostraron reacción en esta zona. El paciente que no reconoció bandas en esta región tenía diagnóstico de AR. Los antígenos de 50 y 37 kDa por mostrar gran reactividad con los sueros de individuos sanos, fueron excluidos para evaluar la reactividad de las tres regiones (Tabla 4).

IET (kDa)	PACIENTES						SUJETOS
	LES	RA	EMTC	ESP	PM / DM	SSp	NORMALES
107	1	-	-	-	-	-	-
106	4	-	-	-	-	1	-
105	5	1	-	-	-	1	-
103	4	1	-	1	-	1	1
102	7	-	1	-	-	1	-
101	20	-	2	-	1	2	3
94	9	1	1	-	-	-	-
93	11	1	2	-	-	1	1
92	22	-	1	-	3	4	1
80	19	-	4	4	1	3	5
84	17	-	2	-	-	-	2
80	10	-	2	4	-	-	2
78	15	-	2	-	1	2	-
77	2	-	-	-	-	-	-
76	29	1	-	-	1	3	2
75	23	1	3	-	-	5	11
71	26	1	4	2	1	3	6
70	15	1	4	1	-	4	7
67	50	1	4	-	1	3	7
65	36	3	3	3	-	2	7
63	9	1	3	1	-	4	6
59	19	-	3	4	2	3	7
58	19	2	3	-	1	3	3
55	10	1	3	1	3	1	-
52	4	-	-	-	-	2	-
50	83	5	10	5	5	10	37
TOTAL	85	5	10	5	5	10	40

Tabla 1. Número de pacientes con diversas ERAI y de sujetos normales, que reaccionaron por IET con cada uno de los antígenos del ETC HEP-2, en la región entre 50 kDa y 107 kDa.

IET (kDa)	PACIENTES						SUJETOS
	LES	RR	EMTC	ESP	PM / DM	SSp	NORMALES
48	18	-	-	-	-	2	-
46	22	1	2	1	1	3	1
44	38	-	-	-	-	4	-
43	15	-	1	-	-	1	1
41.5	18	-	1	-	-	-	-
40	7	-	1	-	-	-	-
38	5	-	-	-	-	2	-
37	64	4	6	5	4	5	8
35	15	-	1	-	-	2	-
34	11	-	2	1	2	3	-
33	14	-	-	-	-	1	-
32	13	1	2	-	1	5	-
31	18	1	-	-	1	2	-
30	4	-	-	-	-	-	-
29	25	-	2	-	-	-	-
28	26	-	2	-	-	-	-
27	8	-	-	-	-	-	-
26	6	-	-	-	-	-	-
24	18	-	-	-	-	-	-
22	7	-	-	-	-	1	-
TOTAL	85	5	18	5	5	18	48

Tabla 2. Número de pacientes con ERAI y de sujetos normales, que reaccionaron por IET con cada uno de los antígenos del ETC HEP-2, en la región comprendida entre 20 y 48 kDa.

IET (kDa)	PACIENTES						SUJETOS NORMALES
	LES	RR	EMTC	ESP	PM/DM	SSp	
19.5	69	4	8	5	4	9	-
18.2	73	3	9	5	5	9	1
17.8	52	2	7	-	2	2	-
16.9	18	-	3	-	1	-	-
15.8	1	-	-	-	-	-	-
15.5	2	-	-	-	-	-	-
14.1	15	1	2	-	-	2	-
TOTAL	85	5	18	5	5	18	48

Tabla 3. Número de pacientes e individuos sanos, que reaccionaron por IET con los antígenos del ETC HEP-2 con peso molecular entre 28 y 14 kDa.

ERRI	Núm Total	PATRON DE IET (Bandas en kDa)				
		94-52	58	37	48-21	19.5- 14.1
LES	85	85	83	64	88	85
RR	5	5	5	4	1	4
ESP	5	5	5	5	1	5
PM/DM	5	5	5	4	2	5
EMTC	18	9	18	6	4	18
SSp	18	18	18	6	18	18
Total	128	119	128	89	98	119
Sanos	48	29	37	8	3	1

Tabla 4. Número de sueros de pacientes con alguna de las ERRI estudiadas, que reaccionaron con los antígenos de cada una de las regiones determinadas por el peso molecular .

6.3. ANALISIS POR INMUNOLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR LOS PACIENTES Y LOS SUJETOS SANOS.

Mediante el análisis gráfico de inmunoplot de frecuencias simples o frecuencias de reconocimiento (%), se realizó la comparación (tabla 1,2 y 3) entre los antígenos del ETC HEp-2 de las regiones estudiadas, con los sueros de los distintos grupos de pacientes y su relación con la frecuencia de reactividad de los sueros de individuos sanos. La región de 107-50 kDa (Fig. 4-A), mostró en general reacción cruzada, ya que se observaron bandas tanto en los sueros de pacientes como en los sueros de individuos sanos. Las bandas específicas de enfermedad se registraron en mayor número con antígenos de Mr menores de 50 kDa (Fig.4-B y C), mientras que los sueros control ocasionalmente mostraron reactividad. Las bandas antigénicas que presentaron mayor frecuencia de reacción, en sueros de pacientes con cualquiera de las EARI, se encontraron en la región de 14 - 20 kDa ya que éstos poseían autoanticuerpos hacia algunos de estos siete antígenos (Fig.4-C). Las frecuencias de reconocimiento en esta zona fueron: antígeno de 19.5 kDa, 82%; de 18.2 kDa, 87%; de 17.8 kDa, 54%; de 16.9 kDa, 18%; de 15.8 y 15.5 kDa, 1%, y de 14.125 kDa, 17%. Como ya se mencionó, el 97.5% de los sueros de los individuos sanos no reconocieron antígenos en esta zona, y solamente un suero (2.5%) identificó la banda de 18.2 kDa.

•

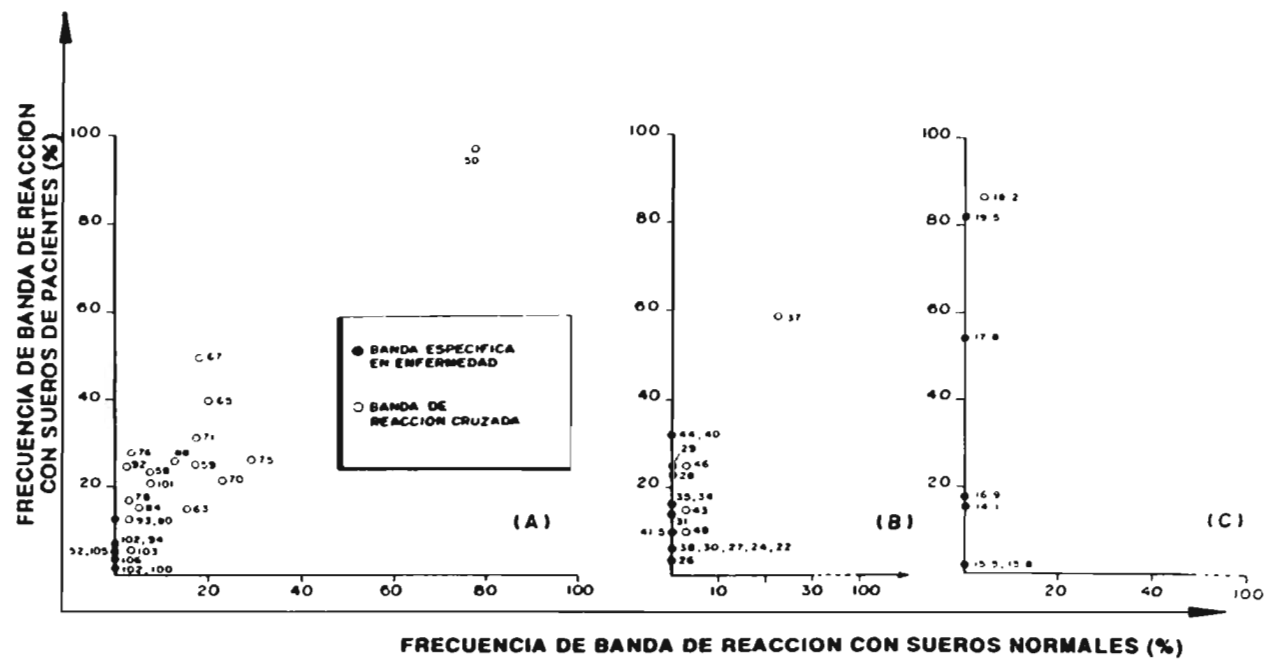


Fig. 4. Inmunoplot de las frecuencias con que los sueros de pacientes con diversas ERM y los sujetos normales reconocen cada uno de los antígenos del ETC NEp-2, localizados entre las Mr de 107- 50 kDa (A); entre 48 - 21 kDa (B), y entre 20 -14 kDa (C).

6.4. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON LES Y DE INDIVIDUOS SANOS.

El análisis se llevó a cabo graficando la frecuencia de reconocimiento de los sueros de pacientes con LES y de sujetos sanos (ver tabla 1) de las bandas antigénicas detectadas en la región de 107 a 50 kDa (Fig. 5-A). Los antígenos reconocidos por los sueros de pacientes con LES y no por los controles, fueron los correspondientes a las Mr de : 48, 44, 41.5, 40, 38, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 24 y 22 kDa. Dentro de ellos se localiza el antígeno de Sm (28-29 kDa) y el antígeno La (48 kDa). Otros antígenos mostraron bandas específicas de enfermedad, aunque con frecuencia reducida (10%), por lo que no se consideraron antígenos de importancia diagnóstica. Así mismo, se pueden observar múltiples bandas de reactividad cruzada, en las que destaca la de 50 kDa que presenta una frecuencia de reconocimiento cercana al 100%. En la región de 48 a 20 kDa (Fig. 5-B) sobresale el antígeno de 37 kDa que muestra una frecuencia de reconocimiento elevada tanto en los pacientes como en los controles. Del análisis gráfico (Tabla 3) de la región de 20 a 14 kDa, se observa una frecuencia elevada de reconocimiento con los sueros de los pacientes, particularmente en los antígenos de 19.5 kDa y 17.8 kDa por lo que se consideran bandas específicas de enfermedad (Fig. 5 C).

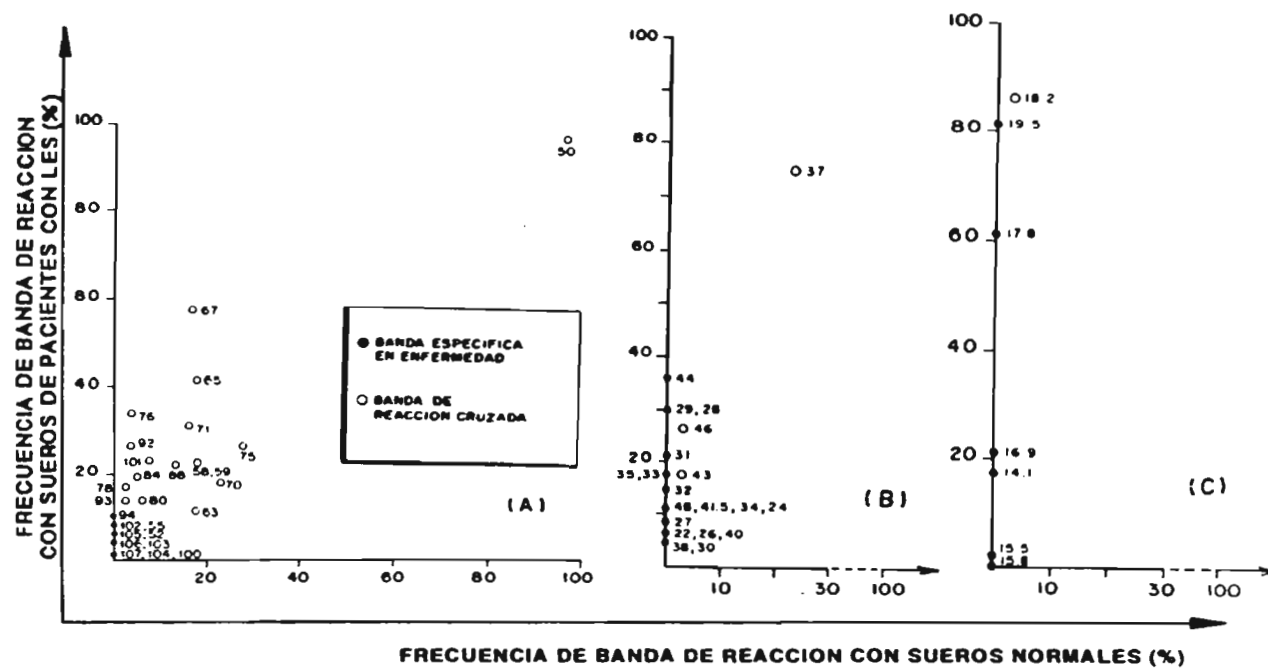


Fig. 5. Inmunoplot de los sueros de pacientes con LES, comparados con los sueros de individuos sanos que reaccionaron con los diferentes antígenos del ETC NEp-2, en las regiones de 107 a 50 kDa (A), de 40 a 20 kDa (B) y de 20 a 14 kDa (C).

6.5. ANALISIS POR INMUNOLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON RA Y DE INDIVIDUOS SANOS.

Aunque el número de pacientes es reducido, se aprecia que el comportamiento del inmunoplot es similar al observado en los pacientes con LES en la región de 187 a 58 kDa y de 14 a 28 kDa (Fig.6-A y C). En cambio, la región de 28 a 48 kDa (Fig.6-B), no es relevante ya que sólo los antígenos de 31 kDa y de 32 kDa, aunque específicos de enfermedad, lo hacen con una frecuencia reducida; además, también son detectados en los sueros de pacientes con LES, por lo que no se les consideró significativos para el diagnóstico de RA.

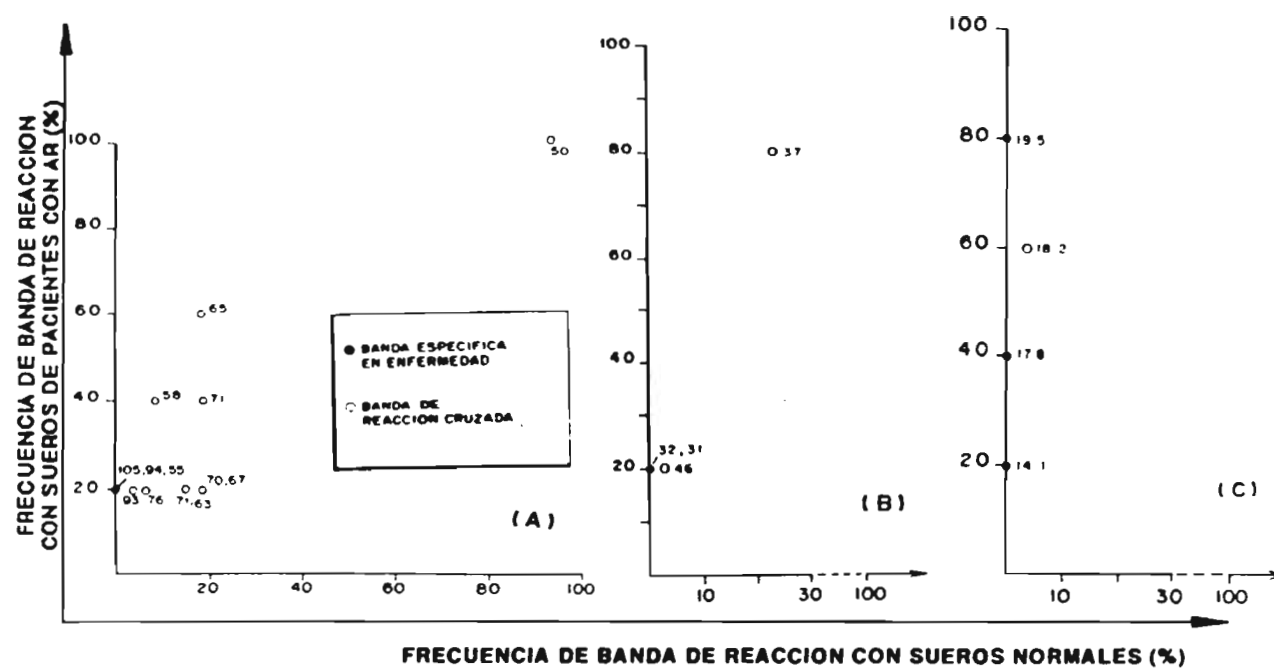


Fig. 6. Inmunoplot de cada uno de los sueros de pacientes con AR, con respecto a los sueros de sujetos sanos que reaccionaron con cada uno de los antígenos comprendidos en las regiones de 107 a 50 kDa (A), de 48 a 28 kDa (B) y de 28 a 14 kDa (C).

6.6. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON EMTC Y DE INDIVIDUOS SANOS.

Las gráficas mostraron las mismas características en las diferentes regiones (Fig.7-A y C). En la región de 107 a 50 kDa la mayoría de los antígenos presentaron bandas de reacción cruzada y en la región de 20 a 14 kDa la mayoría presentaron banda específica de enfermedad, obteniéndose la mayor frecuencia, con algunos de estos antígenos. En la región de 48 a 20 kDa (Fig.7-B) se observaron numerosas bandas específicas de enfermedad, pero la mayoría de ellas se encontró también en pacientes con LES, con excepción del antígeno de 35 kDa, que se presentó con una frecuencia de reconocimiento sólo del 10%, por lo que no se consideró significativa.

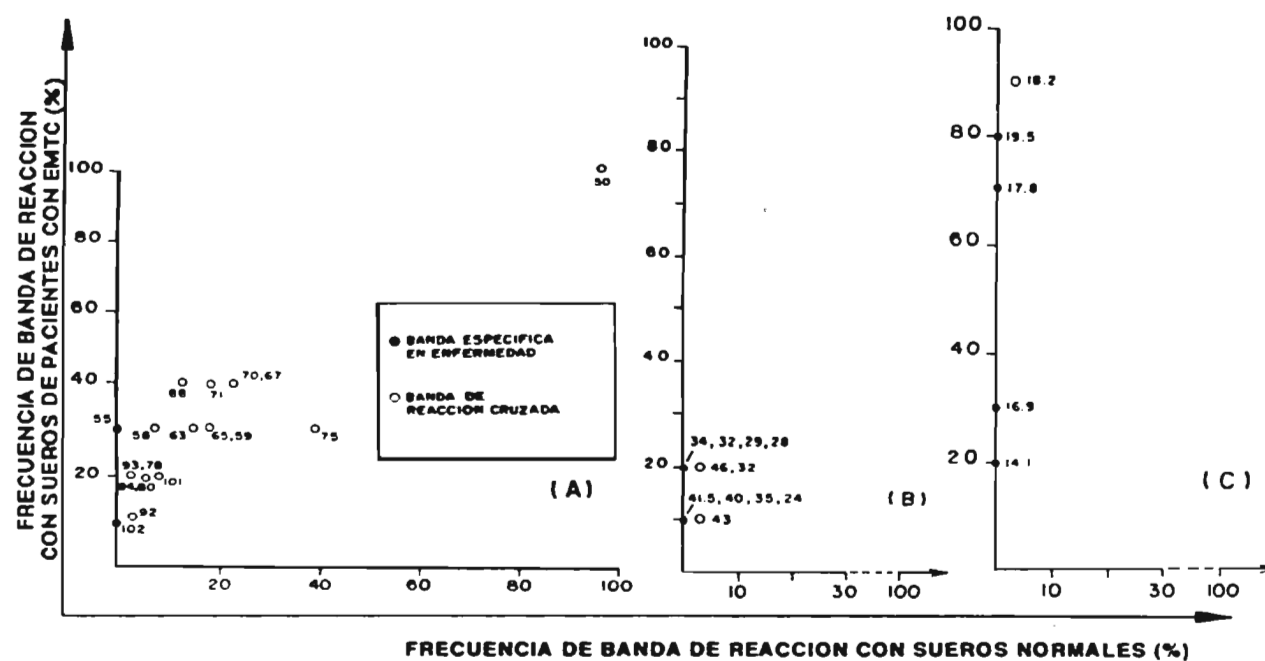


Fig. 7. Comparación por análisis gráfico de inmunoplot de las frecuencias de reactividad obtenidas entre los sueros de los pacientes con EMTC y sujetos normales con cada uno de los antígenos del ETC HEp-2 localizados en las regiones de 187 a 58 kDa (A), de 48 a 28 kDa y de 14 a 28 kDa (C).

6.7. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUEROS DE PACIENTES CON ESP Y DE INDIVIDUOS SANOS.

Aunque la gráfica muestra que la mayoría son bandas de reacción cruzada, llaman la atención dos de ellas, una de 80 kDa y otra de 88 kDa por su elevada frecuencia de reconocimiento (88%) (Fig.8-A). La región de 48 a 20 kDa mostró sólo tres antígenos específicos de enfermedad, comunes con LES (Fig.8-B) y en la región de 14 a 20 kDa (Fig.8-C) sólo se encontró el antígeno de 19.5 kDa como banda específica de enfermedad en el 100% de los casos.

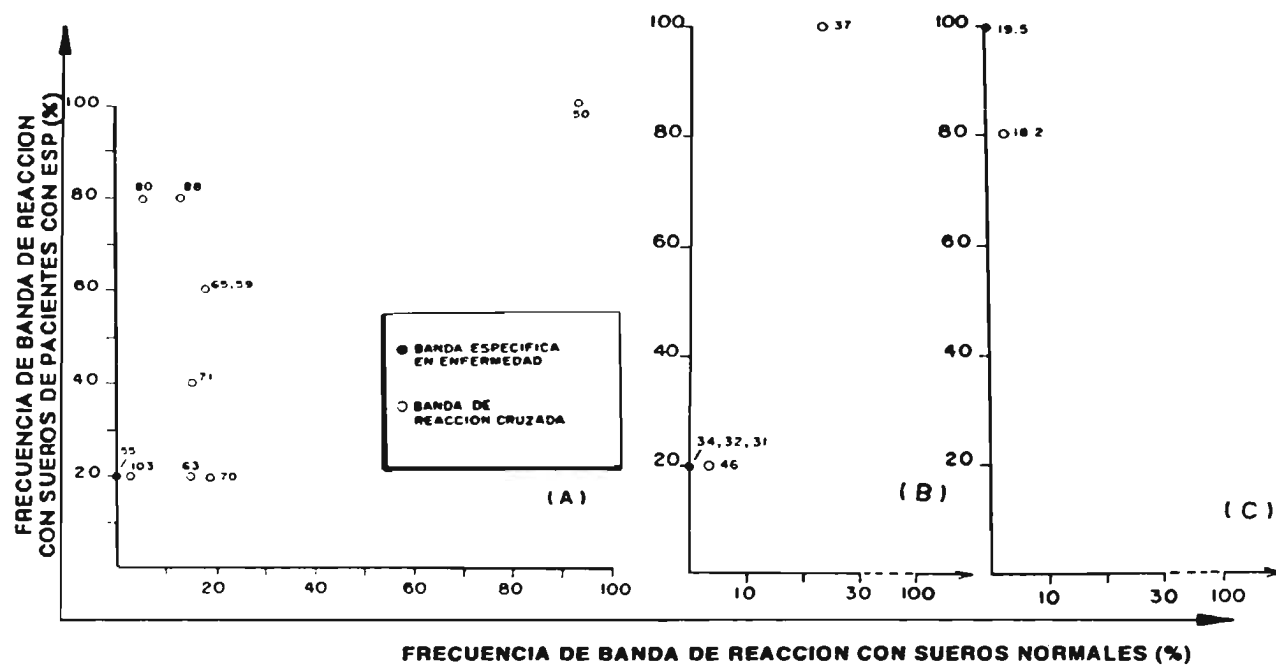


Fig. 8. Comparación por análisis gráfico de inmunoplot de las frecuencias de reactividad obtenidas entre los sueros de los pacientes con ESP y sujetos normales con cada uno de los antígenos del ETC HEp-2 localizados en las regiones de 187 a 50 kDa (A), de 48 a 20 kDa y de 14 a 20 kDa (C).

6.8. ANALISIS POR INMUNOLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUELOS DE PACIENTES CON PM/DM Y DE INDIVIDUOS SANOS.

La representación gráfica de la región de 107 a 50 kDa, indica que la mayoría de los antígenos dieron, como en los demás padecimientos, bandas de reacción cruzada; sin embargo, destaca una banda específica de enfermedad de 55kDa, que se presentó con una frecuencia del 68% (Fig.9-A), y que en LES fue menor del 10%. La región de 48 a 20 kDa mostró sólo un antígeno específico, aunque común con LES (Fig.9-B). Como en las otras enfermedades estudiadas, la región de 14 a 20 kDa mostró ser nuevamente la de mayor frecuencia en banda específica de enfermedad, aunque sólo presentó reactividad con cuatro de los antígenos de esta zona (Fig.9-C).

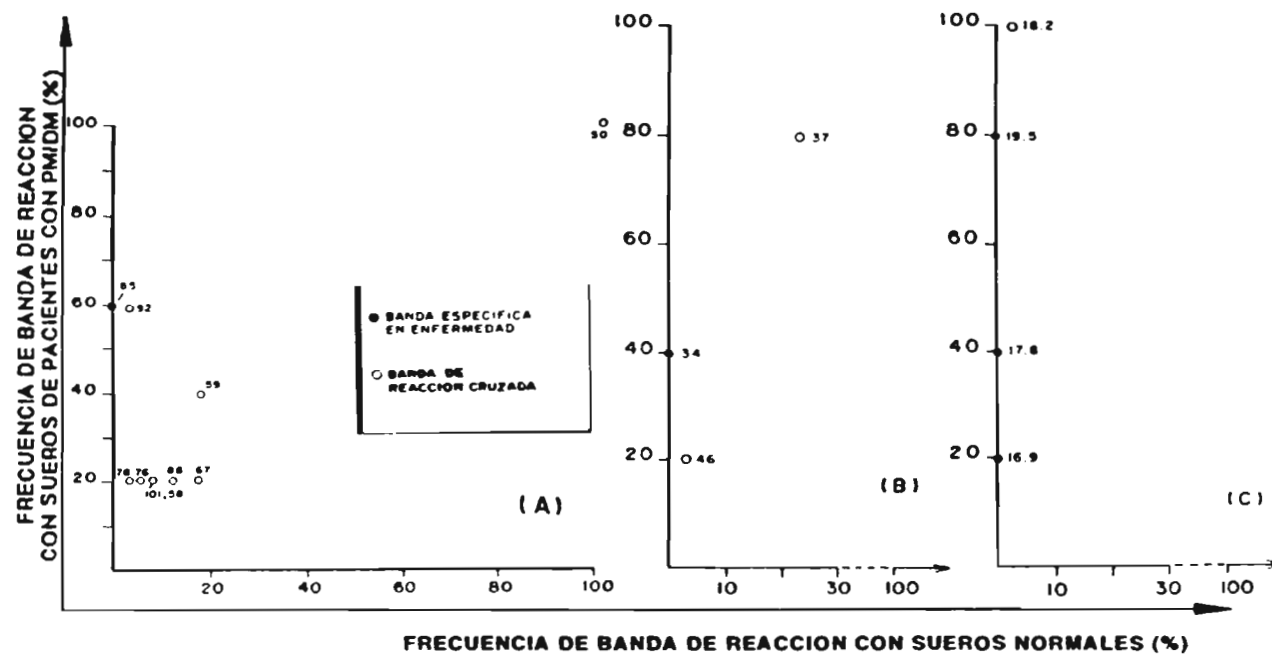


Fig. 9. Comparación por análisis gráfico de inmunoplot de las frecuencias de reactividad obtenida entre los sueros de los pacientes con DM/PM y sujetos normales con cada uno de los antígenos del ETC MEp-2 localizados en las regiones de 187 a 58 kDa (A), de 48 a 20 kDa y de 14 a 20 kDa (C).

6.9. ANALISIS POR INMUNOPLOT DE LAS BANDAS ANTIGENICAS RECONOCIDAS POR SUECOS DE PACIENTES CON SSP Y DE INDIVIDUOS SANOS.

Las tres regiones estudiadas presentan similitud con las gráficas de LES, aunque sobresale el antígeno de 32 kDa que muestra una frecuencia del 50% en SSP (Fig.10-B). La región de 107 a 50 kDa presenta los antígenos de 52 y 78 kDa que en pacientes con SSP aparece con una frecuencia específica del 20% (Fig.10-A). En la región de 14 a 20 kDa (Fig.10-C), hay sólo reactividad a cuatro de los antígenos; donde el de 19.5 kDa muestra una frecuencia específica del 90%.

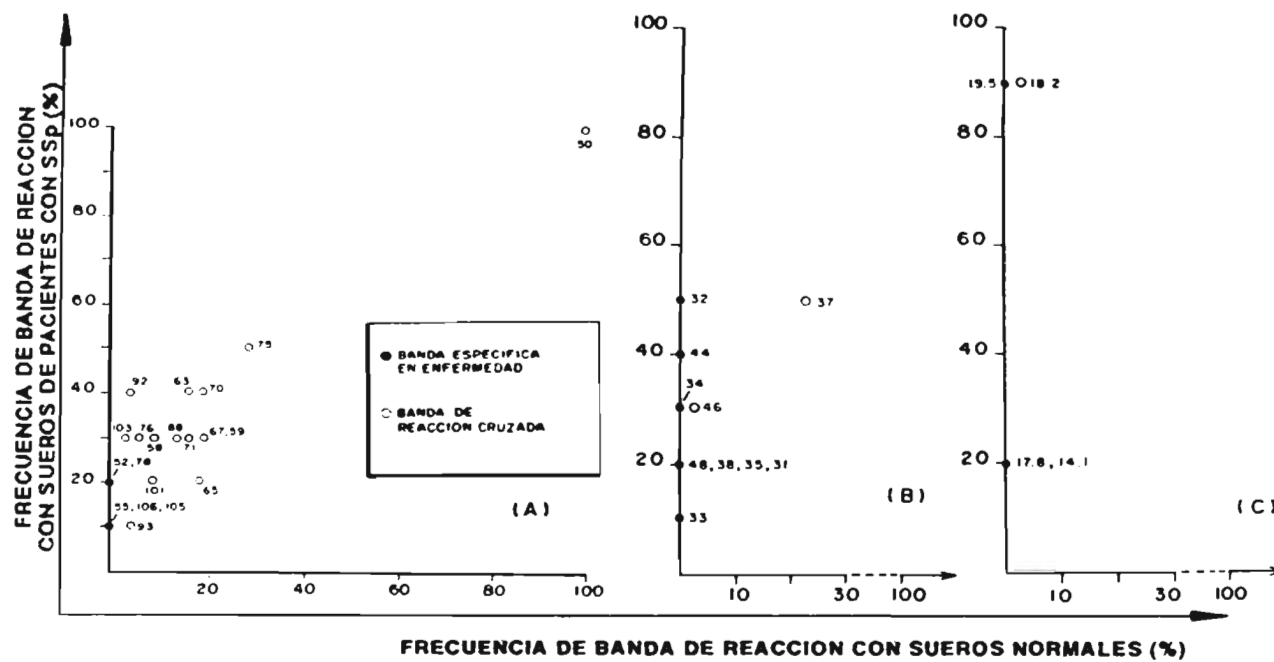


Fig. 10. Comparación por análisis gráfico de inmunoplot de las frecuencias de reactividad obtenidas entre los sueros de los pacientes con SSP y sujetos normales con de cada uno de los antígenos del ETC NEp-2 localizados en las regiones de 107 a 50 kDa (A), de 48 a 20 kDa y de 14 a 20 kDa (C).

6.10. ANÁLISIS FACTORIAL ENTRE PACIENTES CON ERAI Y SUJETOS SANOS EN LAS TRES REGIONES DE LA IET.

Debido a que uno de los objetivos de este proyecto es el identificar el conjunto de antígenos reconocidos únicamente por autoanticuerpos presentes en sueros de pacientes con diversas ERAI, se puso mayor atención a los antígenos comprendidos entre 14 y 20 kDa. En este grupo se encontraron siete antígenos que al ser comparados entre sí o con los existentes en las otras dos zonas del patrón de IET, se pudo deducir en forma indirecta, que los autoanticuerpos implicados no presentan reacción cruzada con los antígenos de las otras dos regiones, así como tampoco entre ellos. En los diferentes patrones de IET estudiados se llegó a encontrar a cualquiera de estos antígenos en ausencia de todos los demás. La elevada reactividad antigénica en la zona de 14 a 20 kDa, de los sueros de pacientes con diversas ERAI, al ser analizada

SUJETOS	Mr DE LAS BANDAS (kDa)		
	107-50	40-21	20-14
ERAI	100%	82%	99%
SANOS	73%	8%	2.5%

Tabla 5. Resumen de las frecuencias de reconocimiento de los sueros de pacientes y controles normales, por los antígenos del ETC HEp-2 en las tres regiones del patrón de IET.

estadísticamente por la prueba de diseño factorial 2 X 2 (77), resultó con una frecuencia del 99% para el grupo en estudio, aún incluyendo aquellos pacientes reportados como seronegativos por otras técnicas de laboratorio para la detección de AAN, como la IFI; el 1% restante correspondió a un sujetos con AR que no dió bandas a este nivel (Tabla 5). La frecuencia en la región de 20 a 48 kDa es del 82% para los pacientes y del 8% en los controles. En la zona comprendida entre 50 a 107 kDa es del 100% en las diversas ERAI y del 73% en los sujetos normales.

6.11. IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPLASMATICA DE CELULAS HEp-2.

Como la región de 14-28 kDa es donde se encuentran los antígenos de mayor interés, por su elevada frecuencia de reactividad específica, se procedió a determinar cual era el origen celular de estos antígenos (Fig.11). Las fracciones nuclear y citoplasmática, de las células HEp-2, sometidas a corrimiento electroforético en PAGE-SDS al 12.5% indicaron que los antígenos comprendidos en la región de 28 a 14 kDa se localizan primordialmente en la fracción nuclear, la cual a este nivel presentó una mayor concentración y número de bandas, que la fracción citoplasmática donde fueron escasas y de baja concentración. Cuando estas PAGE-SDS se compararon con las IET con ETC HEp-2, se encontró que posiblemente los antígenos entre 14 a 28 kDa corresponden a las proteínas de origen nuclear.

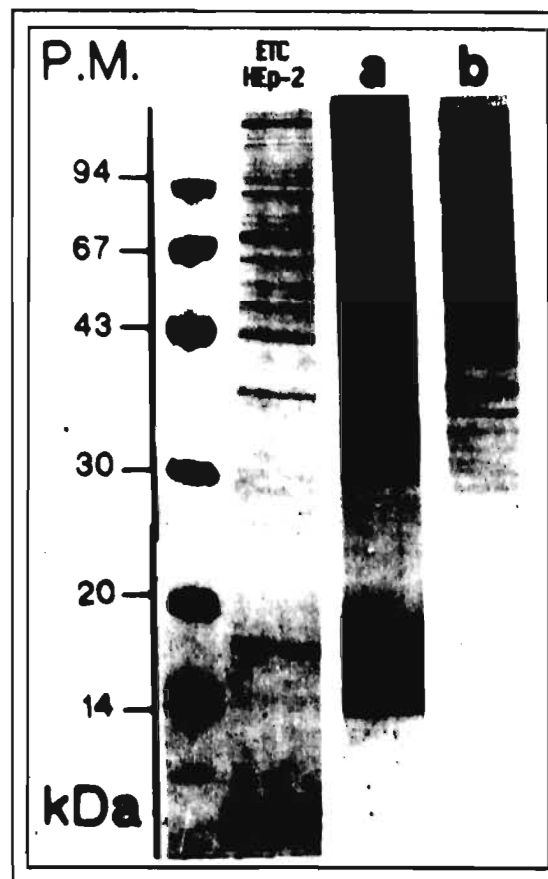


Fig. 11. PAGE-SDS al 12.5% con ETC HEP-2 comparado con (a) extracto nuclear y (b) extracto citoplasmático.

7 DISCUSION

El análisis de reconocimiento por IET de los antígenos del ETC HEp-2 por los sueros de pacientes con EARI y de sujetos sanos, indica que la región de 20 a 14 kDa muestra en la mayoría de los padecimientos, bandas específicas de enfermedad, algunas con una frecuencia de 90 a 100%; solamente uno de los pacientes con RR no reaccionó con estos antígenos, probablemente debido a que los autoanticuerpos característicos de esta enfermedad, están dirigidos hacia la Inmunoglobulina IgG; los demás pacientes con RR sí presentaron bandas en esta región, por lo que resulta de interés determinar la presencia o ausencia de estos autoanticuerpos que pueden tener relación con la evolución del padecimiento.

La región entre 107 a 50 kDa, presentó múltiples bandas de reacción cruzada en la mayoría de los casos, por lo tanto esta región no se considera de importancia diagnóstica. Otras bandas como las de 80 y 88 kDa que se presentan en los pacientes con ESP con una frecuencia del 80%, con Mr similar a la de algunos antígenos ya descritos en escleroderma; es de notar que estos antígenos fueron reconocidos por el 15% de los sujetos normales. En este caso sería de interés por una parte determinar por el método de foco isoelectrico la existencia de antígenos que pudieran tener una misma Mr pero diferente punto isoelectrico y por otra, si están comprometidos tanto autoanticuerpos naturales como marcadores de enfermedad. Los sueros de pacientes con PM/DM reconocieron un antígeno de 55 kDa,

con una frecuencia del 60 %, el cual posiblemente corresponde al antígeno Jo-1 ya descrito (53). Las bandas antigénicas que sobresalieron por su alta frecuencia reactividad cruzada fueron la de 50 y la de 37 kDa; por lo que no se les consideró de importancia como marcadores de enfermedad. No se consideró conveniente emplear una dilución superior a 1:750, para eliminar la reactividad de los sueros normales debido a que se perdía sensibilidad para detectar los autoanticuerpos marcadores de enfermedad en las otras regiones.

En la región de 40 a 20 kDa, se encontró un mayor número de antígenos y bandas específicas de enfermedad en pacientes con LES, en comparación con los otros padecimientos; algunos antígenos se pudieron identificar por su Mr, como el de 28-29 kDa correspondientes al antígeno Sm y el de 47 kDa correspondiente a SSB/La; sin embargo, esta región no se considera importante para identificar otro tipo de ERAI, ya que en ocasiones los pacientes no presentan reactividad en esta zona. Con diferente frecuencia de reconocimiento se han encontrado antígenos en diversas enfermedades como el de 34 kDa en LES, EMTC, ESP, SSp y en PM/DM, siendo más en alguno más relevante que en los demás, como sucede para PM/DM donde la frecuencia 40%, por lo que puede ser de interés su presencia como característica de enfermedad. Es necesario trabajar con un número mayor de muestras para definir la validez de este hallazgo.

La frecuencia de reactividad de los antígenos de las tres regiones del ETC HEp-2 con los sueros de pacientes y del grupo

control en el diseño factorial 2 x 2, mostró que la mayor diferencia se registra entre 14 y 20 kDa (96.5%), lo que le dió a esta región una importante significancia diagnóstica. La frecuencia en la región de 21 a 48 kDa fue del 78%, considerandose también de importancia diagnóstica, ya que como se observa en el inmunoplot, la mayoría de los autoanticuerpos pertenecieron a pacientes con LES; en cambio la región de 50 a 107 kDa muestra una diferencia de frecuencia del 27%, indicando que por esta metodología, la determinación de los antígenos en esta región no ofrece mucha utilidad diagnóstica.

Los antígenos localizados en la región comprendida entre 14 y 20 kDa, corresponde a los antígenos buscados, ya que reaccionaron con los autoanticuerpos contenidos en los sueros de la mayoría de los pacientes con diversas ERAI incluidos en el presente estudio, los cuales no tuvieron reactividad con los sueros de los sujetos sanos. En esta región, se detectaron siete bandas que al ser comparadas entre sí o con las existentes en las otras dos regiones, se encuentra en forma indirecta, que los autoanticuerpos implicados no presentan reacción cruzada con los antígenos de las otras dos regiones, así como tampoco en la misma región. En los diferentes patrones de IET estudiados, se observó que cualquiera de estas siete bandas antigénicas se presenta aún en ausencia de todas las demás. Lo anterior apunta la gran heterogeneidad de la respuesta autoinmune, manifiesta en la gran diversidad de autoanticuerpos que se presentan en cada uno de los pacientes. Además de los antígenos reportados en la literatura, se observan muchos otros en los patrones de

Inmunoblot, cuya importancia diagnóstica se desconoce. Este grupo de antígenos presente en la región entre 14 y 28 kDa reconocidos sólomente por los sueros de pacientes podría ser empleado en pruebas tamiz para investigar la presencia de ERAI, particularmente LES, ya que éstos constituyen el 70% de la población estudiada, y el resto está constituido por pacientes con AR, EMTC, ESP, PM/DM y SSP. Por lo tanto es conveniente analizar una población más amplia de estas últimas enfermedades, y determinar qué otros autoanticuerpos pueden ser de utilidad para el diagnóstico de las mismas.

Se han empleado extractos crudos de antígenos nucleares y citoplasmáticos en pruebas de ELISA e Inmunodot, encontrándose lecturas basales muy elevadas (78). Esta inespecificidad puede ser explicada por el presente estudio, ya que demuestra la presencia tanto de bandas protéicas en la región de 50 a 107 kDa, de la fracción nuclear como citoplasmática hacia las cuales los sueros de sujetos sanos muestran una elevada reactividad, probablemente por la presencia de autoanticuerpos naturales. Estos representan un inconveniente al efectuar los ensayos de ELISA o Inmunodot, ya que pueden ser los causantes de las lecturas basales tan elevadas, y es por ello que la actual tendencia sea utilizar antígenos purificados. Pero tal procedimiento no permite detectar el grueso de los autoanticuerpos característicos de enfermedad. Por tal motivo, se intentó en el presente estudio purificar el grupo de antígenos del ETC HEp-2 que reconocen el 99% de los pacientes con diversas ERAI, para usarlos en pruebas de ELISA o Inmunodot. El aislamiento de estos

antígenos con Sephadex G-75, no dió buenos resultados (datos no mostrados), por lo que se sugiere como alternativa de purificación, métodos más complejos, como el de electroelución después del corrimiento del ETC HEp-2 por PAGE-SDS. La IET, tiene la ventaja de servir como prueba tamiz y mostrar a la vez un patrón electroforético que pone de manifiesto bandas características de cada padecimiento, como las localizadas entre 21 y 48 kDa presentes primordialmente en los pacientes con LES. Además, en la imagen de inmunoblot de cada paciente con múltiples autoanticuerpos, se identifican tanto antígenos ya reportados en la literatura como algunos otros que aún no lo están. Por tanto, este método ofrece una información más amplia debido a que permite que la alta especificidad y sensibilidad de los autoanticuerpos del paciente identifiquen a los antígenos presentes, que pueden ser caracterizados por su Mr, a diferencia de los métodos convencionales actualmente empleados.

Tanto IET con ETC HEp-2 como la prueba de RAN-IFI reconocieron una gama similar de autoanticuerpos, que permitió detectar pacientes con sospecha de ERAI; No obstante la IET brindó mayor información respecto a la reacción de los autoanticuerpos con sus antígenos específicos, además de una mayor sensibilidad, ya que detectó pacientes reportados como seronegativos por IFI. Por lo tanto, la IET promete ser una prueba más útil que los RAN-IFI para el diagnóstico de pacientes con ERAI.

Es de interés determinar por IET, si la región entre 14 a 28 kDa

es específica de pacientes con ERAI, o si sueros de pacientes con otras patologías, como neoplasias, hepatitis B o C, tuberculosis y miocarditis, donde se han reportado anticuerpos antinucleares en un 20 - 50% de los casos(79), reaccionan también con esta región .

Por la elevada frecuencia de reactividad de estos antígenos, en particular los de 19.5 y 18.2 kDa que se presentaron en más del 80%, sería de interés valorar la importancia de los autoanticuerpos en las manifestaciones clínicas de los diversos padecimientos autoinmunes.

El análisis y caracterización de los diferentes patrones de IET con ETC HEp-2 en cada paciente, permitirá realizar seguimientos prospectivos a largo plazo para evaluar cambios tales como aparición, permanencia o desaparición de los autoanticuerpos, resultantes de la evolución natural de la enfermedad o por efecto del tratamiento.

8 **e**CONCLUSIONES

-Los estudios de IET indican que los antígenos del ETC HEP-2 con Mr entre 14-20 kDa son reconocidos por uno o varios autoanticuerpos presentes en el 99% de los sueros de los pacientes con diversas ERAI estudiados, y sólo por el 2.5% de los sueros de los individuos sanos.

-En esta región los sueros de los pacientes reaccionaron con las siete bandas, con las siguientes frecuencias: el 82% correspondió a la de 19.5 kDa, 87% a la de 18.2 kDa, 54% a la de 17.8 kDa,; 18% a la de 16.9 kDa,; 1% a las de 15.8 y 15.5,; y 17% a la de 14.125 kDa. Solamente uno de los sueros de individuos sanos ensayados (2.5%), dió reacción con la banda de 18.2 kDa.

-Por lo tanto, estas bandas antigénicas se consideraron marcadores de enfermedad y su determinación podría ser importante como ayuda en el diagnóstico serológico de las ERAI, en especial del LES.

-Se propone el uso de los antígenos de 14 a 20 kDa en pruebas tamiz, para distinguir pacientes con sospecha de ERAI.

- El patrón de IET, en la región entre 20 - 48 kDa permite diferenciar a pacientes con LES, mientras que no es concluyente para las otras ERAI estudiadas, aunque la población fue reducida. La

presencia del conjunto de autoanticuerpos en la región entre 14 a 28 kDa no permite diferenciar específicamente a cada una de las enfermedades reumáticas estudiadas, ya que aún entre individuos con un mismo padecimiento la respuesta es muy variada.

-La localización aparentemente nuclear de estos antígenos no descarta la importancia de los antígenos de la fracción citoplasmática, donde se han encontrado algunos que pueden servir para clasificar subgrupos de estas ERRI, como son el anti-Ro (SS-R), anti-Jo, anti-La (SS-B), el anti 56 kDa (54) y el anti-P ribosomal (88).

9

A BREVIATURAS

RAN-IFI	Anticuerpos antinucleares por Inmunofluorescencia
ACA	Colegio Americano de Reumatología
APS	Persulfato de amonio
RA	Artritis reumatoide
ARA	Asociación Americana de Reumatología
BSA	Albumina sérica bovina
C3,C4	Fracciones del complemento
CO₂	Bióxido de carbono
CAST	Calcinosis, fenómeno de Raynaud, Escleroderma y Telangectasia
CuSO₄	Sulfato de cobre
Da	Daltones
D.O.	Densidad óptica
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Acido etilen diamino tetra-acético
ELISA	Del Inglés Enzyme linked immunosorbent assay
EMTC	Enfermedad mixta del tejido conectivo
ERRI	Enfermedad reumática autoinmune
ESP	Escleroderma sistémica progresiva
ETC HEp-2	Extracto total de células HEp-2
HSP	Proteína de choque térmico
IET	Inmunoelectrotransferencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta

IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltones
LES	Lupus eritematoso sistémico
Mr	Masa relativa
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nDNA	Acido desoxirribonucleico nativo
PAGE-SDS	Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodesil sulfato de sodio
PBS	Buffer salino de fosfatos
PM/DM	Polimiositis / Dermatomiositis
PMSC	Fenil metil sulfonil cloruro
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
Sci-70	Autoantígeno en Escleroderma de 70 kDa
SFB	Suero fetal bovino
Sm	Autoantígeno Smith de 28 y 29 kDa
SSp	Síndrome de sobreposición
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilén diamina
TRIS-HCl	Hidrocloreto de tris hidroxil metil amino metano
U1-RNP	Uridina 1- Ribonucleoproteína
V	Volts
Vol/Vol	Volumen a volumen

- 1.- Nakamura R., Nakamura M.C. y Ortiz-Ortiz L.: Conceptos actuales de autoinmunidad y enfermedades autoinmunitarias. En Inmunología. Zambrano, S.A. Primera Edición, Ed. Interamericana McGraw Hill. México. p. 263-264, 1993.
- 2.- Ehrlich, P., Morgenroth, J.: On Haemolysins. Fifth communication. En: Translation in the Collected Papers of Paul Ehrlich. (Traducción) Wochenscher B.K., Pergamon, London. Vol.2 p. 246-255, 1957.
- 3.- Burnet, F.M.: A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. Aust. J. Sci. 28:67-75, 1957.
- 4.- Schwartz R.S.: Autoimmunity and autoimmune disease. En Fundamental Immunology. Paul, W.E. Third Edition. Raven Press L.T.D., New York. p.1833-1835, 1993.
- 5.- Lal, M.Z., Jang, Y.J., Chen, L.K., Geffer, M.L.: Restricted V-(D)-J junctional regions in the T-cell response to lambda-repressor identification of residues critical for antigen recognition. J. Immunol. 144:4851-4856, 1990.
- 6.- Watamabe, F.R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A.,

Nagata, S.: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature 356:314-321, 1992.

7.- Janeway, C.A. Jr.: The immune system evolved to discriminate infections nonself from non infectious self. Immunol. Today 13:1-9, 1992.

8.- Ahmed, S.A., Dauphine, M.J., Montoya, R.A., Talal, N.: Estrogen induces normal murine CD5+ B cells to produce autoantibodies. J. Immunol. 142:2647-2653, 1989.

9.- Okuyama, R., Abo, T., Seki, S., Ohteki, T., Suglura, K., Kusumi, R.: Estrogen administration activates extratymic T-cell differentiation in the liver. J. Exp. Med. 175:661-667, 1992.

10.- Ansar-Ahmed, S., Perrhale, W.J., Talal, N.: Sex hormones immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormones action. Am. J. Pathol. 121:531-551, 1985.

11.- Mountz, J.D., Talal, N.: Retroviruses, apoptosis and autogenes. Immunol. Today 14:532-535, 1993.

12.- Suzuki, H., Kundig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.L., Ohashi, S.P., Griesser, H.,

Taniguchi, T., Paige, J.C., Mak, W.T.: Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin 2 beta receptor. Science 268:1472-1476, 1995.

13.- Hahn, B.H.: Suppression of autoimmune diseases with anti-idiotypic antibodies: Murine lupus nephritis as a model. Springer Semin. Immunopathol. 7:25-31, 1984.

14.- Williams, R.C. Jr., Malone, C.C., Huffman, G.R., Silvestris, F., Croker, B.P., Ayoub, E.M., Massengill, S.: Active systemic lupus erythematosus is associated with depletion of the natural generic anti-Idiotipe (anti-F(ab')₂) system. J. Rheumatol. 22, 6:1875-85, 1995.

15.- Cohen, I.R., Young, D.B.: Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Immunol. Today 12:105-110, 1991.

16.- Rurameas, S.: Natural autoantibodies from Horror Autotoxicus to Gnothi Seauton. Immunol. Today 12:154-159, 1991.

17.- Ohno, S.: Many peptide fragments of alien antigens are homologous with host proteins, thus canalizing T-cell responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:3865-3868, 1991.

18.- Wucherpfennig, K.W., Weiner, H.L., Hafler, D.A.: T- Cell recognition of myelin basic protein. Immunol. Today 12:277-282, 1991.

19.- Barnett, L., Fujinami, R.S.: Molecular mimicry: A mechanism for autoimmune injury. *FASEB J.* 6:840-844, 1992.

20.- Dellabona, P., Peccoud, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C., Mathis, D.: Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 62:1115-1121, 1990.

21.- Herman, A., Kappler, J.W., Marrack, P., Pullen, A.M.: Superantigen mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 9:745-749, 1991.

22.- Peek, R., Westphal, J.A., Pruijnt, G.J.M., Van Der Kemp, A.J.W., Venrooij, W.J.: Adenovirus infection induces loss of HLA Class I and CD3 antigens, but does not induce cell surface presentation of the La (SS-B) autoantigen. *Clin. Exp. Immunol.* 96:395-402, 1994.

23.- Zouali, M., Kalsi, J. and Isenberg, D.: Autoimmune diseases at the molecular level. *Immunol. Today* 14:473-476, 1993.

24.- Sauter, N.P., Atkins, M.B., Mier, J.W., Lechan, R.M.: Transient thyrotoxicosis and persistent hypothyroidism due to acute autoimmune thyroiditis after interleukin-2 and interferon-alfa therapy for metastatic carcinoma-A, case report. *Am. J. Med.* 92:441-446, 1992.

25.- Lorre, K., Karsan, A., Van Daek, F., Boer, M.D., Ceuppens, J.L.:

Interleukin-1 and B7/CD28 interaction regulate Interleukin-6 production by human T cells. Clin. Immunol. Immunopathol. 70:81-90, 1994.

26.- Seigneurin, J.M., Guilbert, B., Courgeat, M.J., Aurameas, S.: Polyspecific natural antibodies and autoantibodies secreted by human lymphocytes immortalized with Epstein-Barr virus. Blood 71:581-584, 1988.

27.- Bona, C.A., Victor-Kobrin, C., Manheimer, J., Bellon, B., Rubenstein, L.J.: Regulatory aims of the immune network. Immunol. Rev. 79:25-44, 1984.

28.- Hurez, U., Kaveri, S. Kazatchkine, M.D.: Expression and control of IgG autoreactivity in normal human serum. Eur. J. Immunol. 23:783-789, 1993.

29.- Carson, D.A.: Genetic factors in the etiology and pathogenesis of autoimmunity. FASEB J. 6:2800-2805, 1992.

30.- Wieben, E.D., Madone, S.J., Pederson, T.: Protein binding sites are conserved in U1 small nuclear RNA from insects and mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1217-1225, 1983.

31.- Shoenfeld, Y., Andre-Schwartz, J., Stollar, B.D.: Anti-DNA

antibodies. En: Systemic lupus erythematosus. Lahita R.G., Ed. Wiley, New York. p. 213-215, 1987.

32.- Fong, S., Chen, P., Fox, R.I.: Rheumatoid factors in human autoimmune disease: Their origin, development and function. *Pathol. Immunopathol. Res.* 5:305-311, 1986.

33.- Harley, J.B.: Autoantibodies are central to the diagnosis and clinical manifestations of lupus. *J. Rheumatol.* 21:1183-1185, 1994.

34.- Kaufmann, S.H.E., Schoeld, B., Embden, J.D.R., Koga, T., Wandurtenbreger, R., Munk, M.E., Steinhoff, U.: Heat-shock protein-60: Implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol. Rev.* 121:67-72, 1991.

35.- Minota, S., Koyasu, S., Yahara, Winfield, J.: Autoantibodies to the heat-shock protein HSP-90 in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 81:106-110, 1988.

36.- Yoshida, M., Yoshida, H., Muso, E., Tamura, T., Shimada, T., Kawai, C., Hamashima, Y.: Clonotypic comparison of IgG anti-DNA antibodies of healthy subjects and systemic lupus erythematosus patients: Studies on heterogeneity and avidity. *Immunol. Lett.* 15:139-144, 1987.

37.- Zarnbiski, M.R., Messner, R.P., Mandel, J.S.: Anti-dsDNA antibodies

in laboratory workers handling blood from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 19:1380-1384, 1992.

38.- Harley, J.B., Gaither, K.K.: Autoantibodies. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 14:43-56, 1988.

39.- Alsbaugh, M.A., Tan, E.M.: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.

40.- Sharp, G.C., Irvin, W.S., Tan, E.M., Gould A.G. Holman H.A.: Mixed connective tissue disease—an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.

41.- Van Denrooij, W.J., Stapel, S.O., Houben, H.: Scl-86, a marker antigen for diffuse scleroderma. *J. Clin. Invest.* 75:1053-1061, 1985.

42.- Harley, J.B., Sestak, A.S., Willis, L.G., Fu, S.M., Hansen, J.A., Reichlin, M.: A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus: Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia or renal disease. *Arthritis Rheum.* 32:826-836, 1989.

43.- Fritzler, M.J.: Immunofluorescent antinuclear antibody tests. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, N.E. Rose, H. Friedman, J.L.

Fahey, Eds. American Society for Microbiology, Washington. p. 733-739, 1986.

44.- Kozin, F., Fowler, M.B. Koethe, S.M.: A comparasion of the sensitivities and specificities of different substrates for the fluorescent antinuclear antibody test. Am. Soc. of Clin. Pathol. 74:785-788, 1980.

45.- Molden, D.P., Nakamura, R.M., Tan, E.M.: Standariztion of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigen (ANA): Use of reference sera of defined antibody specificity. Am. J. Clin. Pathol. 82:57-62, 1984.

46.- Tan, E.M.: Diversity of antinuclear antibodies in progresive systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 23:617-625, 1980.

47.- Harley, J.B., Yamagata, H., Reichlin, M.: Anti-La (SSB) antibody is present in some normal sera and is coincident with anti-Ro (SSA) precipitins in systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol. 11:309-314, 1984.

48.- Maddison, P.J., Skinner, R.P., Ulachylannopolious, P., Brennard, D.M., Hough, D.: Antibodies to nANP, Sm, Ro (SSA), and La (SSB) detected by ELISA: Their specifity and inter-relation in connective tissue disease sera. Clin. Exp. Immunol. 62:337-345, 1985.

49.- Kurki, P., Gripenberg, M., Partanen, P., Helve, T.: Screening test for rheumatic diseases: A combined enzyme immunoassay of rheumatoid factors and antibodies to DNA and extractable nuclear antigens. *J. Clin. Pathol.* 40:1475-1479, 1987.

50.- Habets, W.J., Rooij, D.J., Salden, M.H., Verhagen, A.P., Van Eckelen, C.A., Van De Putte, L.B., Van Venrooij, W.J.: Antibodies against distinct nuclear matrix proteins are characteristics for mixed connective tissue disease. *Clin. Exp. Immunol.* 54:265-276, 1983.

51.- McHugh, N., James, I., Maddison, P.: Clinical significance of antibodies to a 68 kDa U1RNP polypeptide in connective tissue disease. *J. Rheumatol.* 17:1320-1328, 1990.

52.- Van Venrooij, W. J., Halbert, W.J. de Rooij D.J., Van de Putte, L.B.A.: The molecular composition of nuclear and cytoplasmic antigens: a review. En: *Rheumatology*, Brooks P.M., York J.R. Eds. Elsevier, Amsterdam. p.175-180, 1985.

53.- Elkon, K.B., Jankowski, P.W.: Fine specificities of autoantibodies directed against the Ro, La, Sm, RNP, and Jo-1 proteins defined by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *J. Immunol.* 134:3819-3824, 1985.

54.- Rooij, D.J., Van De Putte, L.B., Habets, W.J., Verbeek, A.L., Van

Denrooij W.J.: The use of imminoblotting to detect antibodies to nuclear and cytoplasmic antigens. Scand. J. Rheumatol. 17:353-364, 1988.

55.- Kallenberg, C.G.M., Wouda, A.A., Hoet, M., Van Denrooij, W.J.: Development of connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon. A six years follow up with emphasis on the predictive value of antinuclear antibodies as detected by Immunoblotting. Ann. Rheum. Dis. 47:634-641, 1988.

56.- Shapiro, P.E., Mcallister, G., Lerner, E.A., Lerner, M.A.: Healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus have unique, person specific spectra of antibodies detectable on Immunoblots. Clin. Immunol. Immunopathol. 59:129-138, 1991.

57.- Capín, G.N., Lavalle, M.C., Rodriguez, R.M. and Ortiz-Ortiz, L.: Immunoblot assay for detection of autoantibodies in autoimmune disease. J. Clin. Lab. Anal. 6:319-323, 1992.

58.- Hancock, K.: India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. Anal. Biochem. 133:157-162, 1983.

59.- Guilbert, B., Dighiero, G., Aurameas, S.: Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. J. Immunol. 128:2779-2787, 1982.

60.- Francoeuer, R.M.: Biotechnology in forensic medicine. New ways of fingerprinting. J. Biotechnol. 10: 203-208, 1989.

61.- Lockart, R.Z., Eagle, H.: Requirements for the growth of single human cells. Science 129:252-256, 1959.

62.- Lowry, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685, 1978.

63.- Tan, E.M., Cohen, R.S., Fries, J.F.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 25:1271-1277, 1982.

64.- Riarcón, S.D., Cardiel, M.: Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease of 593 patients. J. Rheumatol. 16:328-334, 1989.

65.- Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., Mc. Shane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.R., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., Medsger, Jr. T.A., Mitchell, D.M., Neustadt, D.H., Pinals, R.S., Schaller, J.G., Sharp, J.T., Wilder, R.L., Hunder, G.G.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 31:315-324, 1987.

66.- Masi, A.T., Rodnan, G.P., Medsger, T.A., Rittman, R.D., D'Angelo, W.R.,

Fries, J.F.: Subcommittee for scleroderma criteria of the Americal Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 23:581-590, 1980.

67.- Bohan, A., Peter, J.B.: Polymiositis and dermatomyositis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292:344-347, 1975.

68.- Bohan, A., Peter, J.B.: Polymiositis and dermatomyositis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292:403-407, 1975.

69.- Christian, C.L.: Connective tissue disease: Overlap syndromes. En: *Rheumatology and Immunology*, Cohen, A.S., Bennett, J.C., Eds. Grune and Stratton, Orlando. p. 175-179, 1986.

70.- Ballou, S.P., Kushner, I.: Anti-native DNA detection by the *Crithidia lucillae* method. *Arthritis Rheum.* 22:321-327, 1979.

71.- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.

72.- Weber, K., Osborn, M.: The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412, 1969.

73.- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4350-4354, 1979.

74.- Hinterberger, M., Petterson, I., Steitz, J.R.: Isolation of small nuclear ribonucleoproteins containing U1, U2, U4, U5, and U6 RNAs. J. Biol. Chem. 258:2604-2609, 1983.

75.- Westeest, A.R.A., Bons, J.C., Van den Brink, H.G., Aarden, L.A., Smeenk, R.J.T.: An improved incubation apparatus for Western blot used for the detection of antinuclear antibodies. J. Immunol. Methods 95:283-288, 1986.

76.- Larraide, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Díaz, M.I., Govezensky, T. Coltorti, E.: Deciphering Western blots of tapeworm antigens reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40:282-290, 1989.

77.- Castro, L.: Diseños Factoriales. En: Diseño experimental sin estadística. Castro L. Ed. Trillas, México. p.133-141, 1982.

78.- Baslund, B., Wieslander, J.: A rapid and semi-quantitative method for detection of autoantibodies by multiple spot immunoassay. J. Immunol. Meth. 169:183-193, 1994.

79.- Bach, J.F.: Inmunología. Nuevas fronteras en el campo de la Inmunopatología. Primera Edición. Limusa, S.A., México. p.825-850, 1984.

80.- Isshi, K., Hrohata, S.: Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 39,9:1483-1490,1996.

11 PUBLICATION

Antigen Association of Total HEp-2 Cell Extract in the Screening of Autoimmune Diseases by Western Blot

Norma Capín,^{1,3} Carlos Lavalle,² and Librado Ortiz-Ortiz³

¹Laboratorio de Inmunología y Reumatología, Hospital de Especialidades Centro Médico La Raza y

²Departamento de Inmunología y Reumatología Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, and ³Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Sera from patients with autoimmune diseases and healthy individuals were comparatively analyzed by Western blot, using total extract from HEp-2 cells as antigen. Bands between 14 and 20 kDa were present in 99% of patients with autoimmune diseases and symptomatic seronegative patients, in con-

trast to only 4% of healthy controls. No bands were detected in the remaining 96% of healthy controls. We propose these antigens as pathologically important for the diagnostic screening of patients with suspected autoimmune disease. © 1996 Wiley-Liss, Inc.

Key words: autoantigen, antinuclear antibody, autoimmune diseases, immunoblot, Western blot

INTRODUCTION

Autoantibodies have been used as pathogenic markers due to their correlation with disease activity, area of damaged tissue, presence of IgG immunoglobulin isotype with high affinity for its ligand, and activity towards monospecific antigens (1). Nevertheless, isotype IgM has occasionally been identified as a cause of disease and IgG as a natural antibody, thus its concentration and type of response (primary or secondary) are also related to pathogenicity (2, 3).

In autoimmune disorders, a great variety of autoantibodies to nuclear and cytoplasmic antigens are produced. The partial identification of these antigens and their antibodies has permitted a greater precision in the definition of rheumatic diseases, such as anti-DNA and anti-Sm in systemic lupus erythematosus (SLE; 4, 5), anti-Ro and anti-La in Sjögren's syndrome (6), and anti-RNP in mixed connective tissue disease (7). These autoantibodies, however, are not determinant in all cases and may even be absent in case of disease (8). Several methods are used to detect the presence of autoantibodies as immune disease markers; indirect immunofluorescence (IIF) for antinuclear antibodies (ANA) is the most frequently used, although others have been described such as double diffusion assay using extractable nuclear antigen (ENA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with purified nuclear antigens obtained by cDNA, immunodot with multiple purified antigens, and others (9-12). Most procedures employ purified antigens, assuming that a particular antigen acts as a marker for disease. Although these methods are highly sensitive and specific, they may not identify the most relevant autoantibodies. Thus, IIF for ANA with HEp-2

cells is an important diagnostic tool, since it allows the detection of a larger amount of autoantibodies. It has, however, limited specificity since its ANA and Western blot patterns do not correspond even when the same antigen is used as a substrate (13). Therefore, we have tried to characterize by Western blot the association between different autoantibodies in autoimmune diseases using not only one, but all antigens found in a total HEp-2 cell extract (THEp-2CE). The presence of specific bands may be useful for the diagnosis, prognosis, and treatment of autoimmune disorders, and in the follow-up of each patient by immunoblot pattern. In this report, the Western blot patterns of the group of patients with autoimmune disorders using THEp-2CE displayed reactivity with a 14-20 kDa antigen group, which is not usually found in the sera of healthy individuals.

MATERIALS AND METHODS

THEp-2CE

HEp-2 cells from a human laryngeal carcinoma cell line were obtained from the Virology Laboratory at the School of Medicine of Universidad Nacional Autónoma de México. They were cultured in RPMI-1640 (GIBCO) with 3% fetal bovine serum supplemented with streptomycin, penicillin, and nystatin (Sigma) at a concentration of 100 µg/ml, pH 7.2. Cells

Received August 25, 1995; accepted September 2, 1995.

Address reprint requests to Librado Ortiz-Ortiz, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

were incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C until 100% confluence was obtained; they were then harvested with a trypsin-EDTA solution (Sigma). Then, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) 7.2 with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.2 M, and washed again with PBS 7.2 supplemented with phenylmethyl-sulfonyl-chloride 0.5 mM. Afterwards, cells were lysed by freezing and thawing, resuspended in Tris buffer (31 mM tris, 47 mM glycine, 0.8 mM sodium dodecyl sulfate [SDS], pH 8.3), adjusted to 500 µg/ml, and stored at -20°C.

Sera

The sera were obtained from 145 patients at the Hospital de Especialidades Centro Médico La Raza (Mexico City). From these, 85 were from patients diagnosed with SLE according to the American Rheumatism Association (ARA) classification criteria (14); 10 sera samples corresponded to patients with mixed connective tissue disease according to Alarcón's criteria (15), 5 sera samples were from patients with rheumatoid arthritis by ARA criteria (16), 5 sera samples were from patients with progressive systemic sclerosis according to Masi et al. (17), 5 were from patients with dermatomyositis according to Bohan and Peter (18), 10 were from patients with overlap syndromes (19), and 25 sera samples were from healthy blood bank controls. Diagnostic aids included ANA determined by IIF on HEp-2 cells, anti-DNA by IIF on *Crithidia luciliae* (20), and complement C3 and C4 for nephelometric immunoassay by means of a Behring laser-nephelometer.

Western Blot

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS was performed with a 12.5% spacing gel and a 3.5% concentrating gel. The procedure was carried out as described by Laemmli (21), using 1.5 mm thick 18 × 16 cm plates. Electrophoresis and immunoblotting were performed under the same conditions as previously described (13). The peroxidase conjugate goat anti-human IgG+IgA+IgM (Zymed) was used at a 1:2,000 concentration, incubated 18 hours at 4°C in agitation, washed with 0.3% PBS Tween 20, developed with 4-chloro-1-naphthol (Sigma) and perhydrol (Merck), rinsed 1 hour in distilled water, and dried on filter paper. The relative mass (Mr) of relevant antigens was calculated by linear regression analysis.

RESULTS

The Western blot patterns of the sera from patients with diverse autoimmune diseases exhibited a wide variety of bands. Nonetheless, seven bands ranging from 14 to 20 kDa were constantly present in most patients and only one control. Also, the majority of patient and control sera (97%) displayed a 50 kDa band which is therefore considered to correspond to a nonpathogenic autoantibody (Fig. 1).

Patient autoantibodies displayed diverse frequencies to the different antigens in the 14–20 kDa zone. However, in a 2 × 2 factor analysis, the association of this antigen group displayed a frequency of 99% in the sera of patients with immune disorders, including those with negative test results by other methods; only 1% of the patients did not present a band in the 14–20 kDa zone. Ninety-six percent of control sera did not

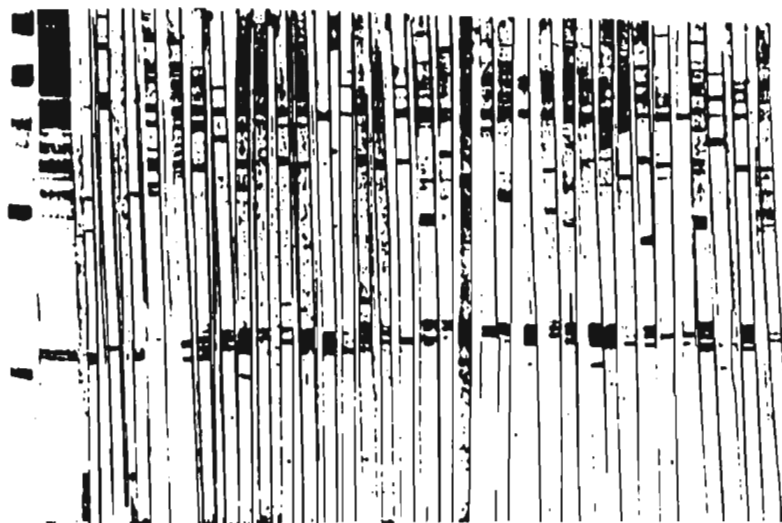


Fig. 1. Western blot patterns in sera 1:750 dilution of patients with diverse autoimmune rheumatic diseases. The low molecular weight markers

were 94, 67, 43, 30, and 14.4 kDa (Pharmacia). The immunoblots showed the presence of different band associations between 14 and 20 kDa.

react in this zone; only one (4%) serum sample showed a positive band (Fig. 2).

The Mr of the antigens in relation to the band frequency in patient and control sera was analyzed by graphic immunoplotting, simple frequencies, or recognition frequency (22). Patient sera exhibited the following antigenic frequencies: 82% corresponded to 19.5 kDa, 87% to 18.2 kDa, 54% to 17.8 kDa, 18% to 16.9 kDa, 1% to both 15.8 and 15.5 kDa, and 17% to 14.125 kDa. On the other hand, one control serum recognized the 18.2 kDa and all the other control sera showed no antigenic recognition of any other band (Fig. 3).

DISCUSSION

We present a group of sera from patients with autoimmune disorders which specifically react to the group of antigens ranging from 14 to 20 kDa, with a frequency of 99% on the THEp-2CE by Western blot. These antigens can be isolated and used in ELISA or immunodot as a screening diagnostic tool for patients with suspected autoimmune diseases. The Western blot pattern of THEp-2CE identifies previously characterized antigens and is useful in autoimmune disease screening. Furthermore, it can be used to evaluate disease evolution, the long-term appearance or disappearance of autoantibodies and their influence on the clinical course of the disease.

Some authors report elevated background readings when using total extract of nuclear and cytoplasmic antigens in ELISA and immunodot, which can be explained by the natural antibodies found in normal subject sera even at high dilutions (23). The autoantibodies directed to a great variety of cellular antigens in autoimmune diseases are markers which



Fig. 2. Western blot patterns in sera 1:750 dilution of healthy controls. Only one control serum recognized the 18.2 kDa band. The other sera did not detect bands ranging from 14 to 20 kDa.

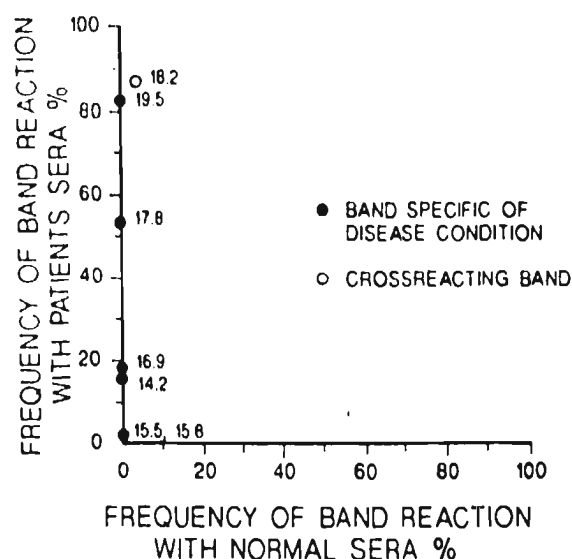


Fig. 3. Immunoplot of simple reaction frequencies of each THEp-2CE antigen band of the 14-20 kDa zone. Comparison of these with patient and normal serum frequencies.

appear as a consequence, not as a cause, of the pathogenic process (24).

Autoantibody identification in the clinical laboratory is performed by methods such as ELISA or immunodot with some of the purified antigens, although in some cases the autoantibody may not be directed against the peptide sequence of the purified antigen and, thus, it may not be detected. IIF with HEp-2 cells as substrate has been the most frequently employed tool for the diagnosis of autoimmune disorders for the past 55 years. However, IIF patterns are not specific for one group of autoantibodies, since different autoantibody groups may exhibit the same pattern. This became clear with the use of Western blot with THEp-2CE (13), which identified autoantibodies to both previously characterized and unidentified antigens. This method generates patterns with a wide range of antigens for autoantibody detection. The resulting antigen-specific immune complex correlates with disease, but not with IIF for ANA. The high sensitivity obtained in this study makes Western blot with THEp-2CE a clinically important method for the detection of autoimmune disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Karla Archer, Isabel Perez-Montfort, and Esperanza Ruiz-Garcia for the preparation of this manuscript.

REFERENCES

1. Yoshida M, Yoshida H, Muso E, Tamura T, Shimada T, Kawai C, Hamashima Y: Clonotypic comparison of IgG anti-DNA antibodies of

- healthy subjects and systemic lupus erythematosus patients: Studies on heterogeneity and avidity. *Immunol Lett* 15:139-144, 1987.
2. Seigneurin JM, Guilbert B, Courgeat MJ, Avrameas S: Polyspecific natural antibodies and autoantibodies secreted by human lymphocytes immortalized with Epstein-Barr virus. *Blood* 71:581, 1988.
 3. Avrameas S: Natural autoantibodies from Homo Autotoxicus to Gnothi Seauton. *Immunol Today* 12:154-159, 1991.
 4. Zarnbiski MA, Messner RP, Mandel JS: Anti-dsDNA antibodies in laboratory workers handling blood from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 19:1380-1384, 1992.
 5. Harley JB, Gaither KK: Autoantibodies. *Rheum Dis Clin North Am* 14:43-56, 1988.
 6. Alsbaugh MA, Tan EM: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 55:1067-1073, 1975.
 7. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR: Mixed connective tissue disease—An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 52:148-159, 1972.
 8. Harley JB, Sestak AS, Willis LG, Fu SM, Hansen JA, Reichlin M: A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus: Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia or renal disease. *Arthritis Rheum* 32:826-836, 1989.
 9. Fritzler MJ: Immunofluorescent antinuclear antibody tests. In *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. NE Rose, H Friedman, JL Fahey, eds. American Society for Microbiology, Washington, 1986, p 733-739.
 10. Harley JB, Yamagata H, Reichlin M: Anti-La (SSB) antibody is present in some normal sera and is coincident with anti-Ro (SSA) precipitins in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 11:309-314, 1984.
 11. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachiannopoulos P, Brennard DM, Hough D: Antibodies to nRNP, Sm Ro (SSA), and La (SSB) detected by ELISA: Their specificity and inter-relation in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol* 62:337-345, 1985.
 12. Kurki P, Gripenberg M, Partanen P, Helve T: Screening test for rheumatic diseases: A combined enzyme immunoassay of rheumatoid factors and antibodies to DNA and extractable nuclear antigens. *J Clin Pathol* 40:1475-1479, 1987.
 13. Capin GN, Lavalie MC, Rodríguez RM, Ortiz-Ortiz L: Immunoblot assay for detection of autoantibodies in autoimmune disease. *J Clin Lab Anal* 6:319-323, 1992.
 14. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Green Schaller J, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277, 1982.
 15. Alarcón SD, Cardiel M: Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease of 593 patients. *J Rheumatol* 16:328-334, 1989.
 16. Arnett FC, Edworthy S, Bloch DA, McShane DJ, Fries DF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324, 1988.
 17. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF: Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23:581-590, 1980.
 18. Bohan A, Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 292:403-407, 1975.
 19. Christian CL: Connective tissue disease: Overlap syndromes. In *Rheumatology and Immunology*. AS Cohen, JC Bennett, eds. Grune & Stratton, Orlando, 1986, p 175-179.
 20. Bullou SP, Kushner I: Anti-native DNA detection by the *Critidia luciliae* method. *Arthritis Rheum* 22:321-327, 1979.
 21. Luemmler UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
 22. Larraide C, Montoya RM, Sciatto E, Diaz MI, Govezensky T, Coliorti E: Deciphering Western blots of tapeworm antigens reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg* 40:282-290, 1989.
 23. Baslund B, Wieslander J: A rapid and semi-quantitative method for detection of autoantibodies by multiple spot immunoassay. *J Immunol Methods* 169:183-193, 1994.
 24. Harley JB: Autoantibodies are central to the diagnosis and clinical manifestations of lupus. *J Rheumatol* 21:1183-1185, 1994.