



19244
2
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE

I. S. S. S. T. E.

**Estudio Clínico Prospectivo en pacientes
con Anti-DNA_n y Anti-Sm en Lupus
Eritematoso Generalizado.**

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO EN:

REUMATOLOGIA CLINICA

P R E S E N T A:

DRA. IRMA AGUILAR FRAUSTO

ASESOR: DR. ERASMO MARTINEZ CORDERO

**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 está 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.

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2-5
MATERIAL Y METODOS.....	6-9
RESULTADOS.....	10-11
DISCUSION.....	12-17
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	19-25

R E S U M E N

Se estudiaron 50 pacientes consecutivos con diagnóstico de LEG, seleccionados de acuerdo a los criterios de clasificación de la Asociación Americana de Reumatología. Se encontró un grupo con anticuerpos anti-DNAn, otro con anticuerpos anti-Sm y un grupo de 6 casos con anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm.

El estudio prospectivo de estos pacientes mostró dos comportamientos, la variación paralela de los anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm y un cambio independiente de estos marcadores al ser estudiados mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA.

En algunos casos esta variación tuvo relación con la fase de actividad y remisión del LEG. Esto sostiene que la producción de autoanticuerpos en LEG puede tener una regulación inmune diferente durante la evolución del padecimiento.

INTRODUCCION:

El LEG está caracterizado por una diversidad de alteraciones clínicas y serológicas, destacando la presencia de autoanticuerpos que pueden provocar lesión tisular, ya sea a través de la formación de complejos inmunes o directamente uniéndose al sitio de la lesión tisular. (1-2) de los diversos autoanticuerpos en las enfermedades del tejido conectivo se encuentran el anti-DNAn y anti-Sm que parecen caracterizar a esta enfermedad.

El anti-DNAn se encuentra hasta en el 98% de los casos y tiene participación activa en la exacerbación del LEG (3), la determinación del anticuerpo anti-DNAn se puede realizar mediante el ensayo de FARR, hemaglutinación, método de Crithidia Luciliae, siendo estos últimos; FARR y Crithidia Luciliae unos de los más específicos (4-5)

Los anticuerpos anti-DNAn en LEG se han encontrado asociados a disminución de complemento y la presencia simultánea de otros anticuerpos parcialmente anti-DNAa, anti-Fosfolípidos y recientemente anticuerpos contra vimetina (6-7-8-9 y 10).

Por otra parte los pacientes con anticuerpos anti-Sm frecuentemente presentan anticuerpos anti-RNPn (11) se ha descrito la transición de un marcador hacia el otro y viceversa, durante la evolución del padecimiento (12).

El anticuerpo anti-Sm parece constituir un marcador de LEG

el cuál se encuentra en un 30% de los casos de esta enfermedad, pero no en otras formas de autoinmunidad (13-14).

La mutua exclusividad de los anticuerpos anti-DNA_n y anti-Sm puede obedecer a mecanismos de regulación independiente del anti-DNA_n y anti Sm, ya que los títulos de los anticuerpos anti-Sm parecen ser más constantes y no correlacionados con la actividad en el LEG. (15)

Evidencias experimentales sostienen que las células T regulan la producción de los anticuerpos anti-Sm, mientras que la producción de los anticuerpos anti-DNA_n es T independiente. (15)

En la mayoría de los casos el anticuerpo anti-Sm se acompaña con anticuerpos anti-RNP_n o anti RNP UI, como se ha demostrado usando 3 métodos diferentes; contra inmunoelectroforesis y técnicas de inmunoblotting y de inmunoprecipitación de RNA, (16)

El antígeno Sm se compone de 5 RNAs nucleares pequeños (U1, U2, U4, U5 y U6), los cuales se asocian con 11 o más polipéptidos designados como A A' B' BB' C D E F G, así como una banda de 68 a 70 Kd. La reactividad con estos componentes del RNA y los polipéptidos respectivos pueden ser demostrados por inmunoprecipitación de RNA y técnicas de inmunoblotting. (16)

Se ha encontrado que los anticuerpos anti RNP/Sm aparecen

y desaparecen en la EMTC. La estructura antigénica del complejo Sm/RNP ha mostrado epítopes comunes reconocidos por sueros de pacientes con LEG y EMTC. (17)

La significancia clínica de los anticuerpos anti-Sm es claramente diferente por ser altamente específicos en LEG y aunque no hay diferencias aparentes en las características clínicas de estos pacientes, hay reportes de nefropatía benigna y su asociación con el involucro del SNC o cuando hay manifestaciones clínicas aisladas de la enfermedad como fenómeno de Raynaud, edema de manos etc. (13-14 y 17)

Algunos pacientes que tienen sólo anti-RNP han mostrado baja frecuencia de anti-DNAn y baja frecuencia de enfermedad renal clínica, la cual sólo se presenta cuando se asocia anti-RNP con anti-DNAn o cuando el RNP se asocia con anti-Sm o anti-Ro/SSA. (18-19-20)

Otros datos que apoyan que las características serológicas definen un comportamiento clínico diferente en LEG son que SSA/Ro se asocia a Lupus neonatal (bloqueo cardíaco congénito). Anticuerpos anticardiolipina con pérdidas fetales repetitivas, plaquetopenia, cuadros de tromboflebitis y manifestaciones de SNC. (18-19-20)

La mayoría de esos estudios se han fundado en hallazgos de manifestaciones clínicas y serológicas en estudios transversales o determinaciones únicas en el transcurso de la enfer

medad, mientras que muy pocos estudios analizan estos cambios serológicos durante su evolución. Por ello realizamos el estudio clínico y serológico durante la evolución de un grupo de pacientes con LEG, con el objeto de tener una noción más clara de los cambios que presentaban los anticuerpos anti-DNA_n y anti-S_m, apreciándose que hay al menos dos perfiles de comportamiento, uno con cambios paralelos de estos marcadores serológicos y otro con variaciones independientes de los mismos.

MATERIAL Y METODOS:

Se incluyeron 50 pacientes consecutivos con diagnóstico de LEG seleccionados de acuerdo a los criterios de clasificación de la ARA. (21)

Todos ellos fueron estudiados en la consulta externa de - Reumatología del Hospital 20 de Noviembre ISSSTE, México D.F., durante el período de marzo de 1989 a octubre de - 1990. Estos pacientes estudiados 43 fueron mujeres y 7 - hombres sus edades variaron entre 13 a 51 años (media de 34.9 años). De ellos 13 casos fueron menores de 16 años. En 20 pacientes se encontró actividad de LEG al momento - del estudio y el resto del grupo estaba asintomático.

PARAMETROS DE INCLUSION:

- 1) Pacientes que cumplieron 4 ó más criterios de la Asociación Americana de Reumatología (ARA).
- 2) Determinación de DNA por el método de Crithidia Luciliae y cuantificación por el método de ELISA.
- 3) Determinación de anticuerpos anti-Sm por Ouchterlony - y cuantificación por el método de ELISA.

METODO:

Estudio Clínico:

A todos los pacientes se les estudiaron las características clínicas que presentaban al momento de la detección y cuantificación simultánea de anticuerpos de anti-DNA y anti-Sm

LABORATORIO:

Los AAN (anticuerpos antinucleares) se determinaron por el método de inmunofluorescencia indirecta empleando como sustratos cortes de riñon de ratón y monocapas de células humanas HEP2 (AFT System 1 Behring Diagnostics, la Jolla, CA.)

La inmunoespecificidad de los anticuerpos anti-DNAn fue determinada empleando monocapas de Crithidia Luciliae, con el método de inmunofluorescencia indirecta (AFT System III Behring Diagnostics, la Jolla, CA.).

Los anticuerpos contra antígenos antinucleares extraíbles, que incluyeron el Sm, RNPn, SSA/Ro, SSB/La y SCL-70 fueron identificados mediante pruebas de Ouchterlony empleando extractos antigénicos crudos obtenidos al partir Timo de conejo y de bazo humano.

El análisis de la identidad inmuno-química se realizó con los sueros prototipos respectivos, siempre y cuando las bandas de precipitación se preservaron después del lavado repetido con citrato de sodio 0.17 M, que permitió la eliminación de las bandas de precipitación no específicas.

Los anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm fueron también estudiados por ELISA de acuerdo a reportes previos. (22-23)

Brevemente las placas de ELISA de poliestireno de 96 pozos (Danemark) fueron sensibilizados con albúmina bovina metilada BSAM (Sigma Chemical Co, St Louis Mo USA) a una concen-

tración de 1 mg/ml por 12 horas a 4°C. Después de este período el DNAn o ENA (antígeno nuclear extraíble), fueron adicionados a sus respectivos pozos, y los sueros de los pacientes fueron incubados a una dilución de 1:300. El DNAn altamente polimerizado de timo de ternera (DNA tipo V Sigma Co.) fue tratado con metaperiodato 0.02M en 0.1M de fosfatos Ph 6.9 y con nucleasa SI, como ha sido descrito (24-25)

Un extracto crudo de timo de conejo fue tratado con RNAsa (Sigma Co) a una concentración de 5 mg/ml y DNAsa (Sigma Co) a 75 ug/ml, con 0.01M de MgCl₂. (23y25)

Los pozos fueron lavados 5 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con Tween 20 al 0.05% y posteriormente se le agregó un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa.

Como sustrato se empleo Ortofenilendiamina OPD (Sigma Co), en una solución de citratos. La reacción fue parada con 2.5N de ácido sulfúrico, la absorbancia (490nm) fue registrada en un minilector de ELISA (Dynatech).

Pare excluir una reacción cruzada en estos sueros de pacientes con anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm, se realizó un ensayo inhibitorio con diferentes concentraciones de los antígenos puros respectivos. Estos antígenos DNAn y Sm fueron incubados en el suero por 60 min. a 37°C, estableciendo posteriormente la lectura de los anticuerpos respec

tivos por ELISA. La media desviación standar para el anti cuerpo anti-DNA_n tuvo un valor de 1.20 ± 0.23 y los niveles de anticuerpos anti-Sm fueron $.89 \pm 0.12$.

RESULTADOS:

Del grupo incluido en este estudio se encontraron 32 pacientes con ANA positivos por la prueba de inmunofluorescencia indirecta. La positividad del anticuerpo anti-DNAn se encontró en 12 pacientes y del anticuerpo anti-Sm en 12 casos. La presencia de ambos anticuerpos simultáneamente se encontró en 6 pacientes. Los niveles de los autoanticuerpos medidos por ELISA, se presentan en la figura 1.

Los pacientes con 2 autoanticuerpos tenían actividad de LEG a nivel pulmonar, renal y en SNC. Al estudiar a los pacientes que presentaron simultáneamente anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm se observó que estos tenían dos comportamientos diferentes en la relación a los niveles séricos de ambos marcadores. El primer grupo con variación paralela de los anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm, y el segundo grupo con una variación independiente de anti-DNAn y anti-Sm.

Como características clínicas en el primer grupo de pacientes se observó:

Elevación de anti-DNAn a títulos altos con elevación simultánea de anti-Sm, la elevación de estos anticuerpos correlacionada con la actividad de LEG, con predominio de la actividad a nivel renal, La nefropatía fue del tipo IV (glomerulonefritis proliferativa difusa), la presencia de ANA positivos con patrones moteados y lineal periférico, un caso con IRC en protocolo de trasplante, la presencia de manifestaciones articula-

res (artritis y artralgias), disminución paralela de los niveles de anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm correlacionada con tratamiento inmunosupresor y la total ausencia de estos auto anticuerpos durante la inactividad de la enfermedad, la figura 2 representa el comportamiento serológico de este grupo.

Las características del segundo grupo fueron:

Elevación del anticuerpo anti-Sm a titulaciones elevadas; - elevación del anticuerpo anti-DNAn independiente del anti-Sm, titulaciones bajas del anticuerpo anti-DNAn en relación al anti-Sm, persistencia del anticuerpo anti-Sm no correlacionada con actividad de los pacientes con LEG, Fluctuaciones del anticuerpo anti-DNAn significativas en relación con la actividad de LEG, presencia de daño renal incluyendo nefropatía tipo IV (glomerulonefritis proliferativa difusa) en dos casos y tipo II (glomerulonefritis de lesiones mínimas) en un caso, manifestaciones mucocutáneas, presencia de serositis, modificación poco significativa inicial de niveles de anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm con el tratamiento inmunosupresor. La figura 3 representa el comportamiento serológico de este grupo.

Las características más representativas en el 1er. grupo - incluyeron daño renal severo y en el segundo grupo menor daño renal y serositis (ascitis y pleuritis).

DISCUSION:

El estudio de los AAN (anticuerpos antinucleares) en LEG - tiene importancia clínica ya que permite definir este diagnóstico y constituyen índices de valoración de la actividad y pronóstico en este padecimiento (3 y 26).

Los AAN se encuentran en el 95% de pacientes con LEG no tratados y activos y los patrones más comunes son el moteado. El homogéneo difuso y el lineal periférico, siendo este último el más frecuente en LEG cuando se asocia con el anticuerpo anti-DNAN (27). Por otra parte su presencia ayuda a explicar los mecanismos biológicos por los que se produce lesión tisular en autoinmunidad.

Los AAN detectados mediante el estudio de inmunofluorescencia indirecta en nuestro grupo de pacientes fueron positivos en el 95% con riñón de ratón y con células HEp-2.

Los anticuerpos anti-DNAN se han identificado en 75 a 95% de pacientes con actividad no tratada en LEG, mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación y ELISA. Su presencia indica actividad en LEG y hay datos que apoyan su relación con daño renal y pulmonar. Los mecanismos sugeridos para este tipo de lesión tisular son la afinidad de los anticuerpos anti-DNAN por la colágena de la membrana basal glomerular (MBG), la reacción cruzada de los anticuerpos anti-DNAN con el heparán sulfato, constituyente normal de la MBG. El predominio de los isotipos IgGI e -

IgG3 que fijan eficientemente complemento y el depósito del anti-DNAn a nivel subepitelial y subendotelial, son factores que aparentemente determinan el daño renal. (28-29-30-31)

Se han encontrado elevaciones del anticuerpo anti-DNAn sérico en exacerbaciones en LEG y esto puede predecir la exacerbación de 8 a 10 semanas previas a las manifestaciones clínicas del LEG (3), sobre todo relacionada con actividad a nivel renal y SNC. Además se ha encontrado un decremento de los niveles de anticuerpos anti-DNAn posterior a tratamiento. En nuestros pacientes encontramos daño renal (nefropatía tipo IV) en relación con la elevación del anti-DNAn, todos ellos durante la fase de actividad y disminución posterior al tratamiento con esteroide e inmunosupresor. En una paciente la cuantificación del anti-DNAn fue mínima durante su periodo de gestación manteniéndose en esta cifra después de su alumbramiento mostrando simultáneamente una ligera elevación en los niveles del anticuerpo anti-Sm y total ausencia de actividad.

Los anticuerpos anti-Sm identificados inicialmente en 1966, (25) ha sido encontrado en un 30% de los pacientes con LEG, mediante el estudio de Ouchterlony y ELISA. Su presencia se considera de significancia diagnóstica y altamente específica en LEG, ya que no se encuentra en personas sanas ni en otras enfermedades reumáticas. (13-14)

Su presencia parece ser más común en enfermos mayores de 40 años de edad y en algunos estudios se han correlacionado con alteraciones neurológicas pulmonares, fenómenos de Raynaud y daño renal menos grave que el encontrado con anticuerpos anti DNA: (12)

Nosotros encontramos que el segundo grupo de pacientes presentó manifestaciones pulmonares (serositis), así como mucocutáneas y en 3 casos la lesión renal fue de tipo II (lesiones mínimas) presentando una mejoría posterior al tratamiento con esteroides. El otro paciente con nefropatía tipo IV mostró anticuerpos anti-Sm con titulaciones elevadas, las cuales declinaron posterior al tratamiento con esteroides a dosis altas e inmunosupresores (azatioprina). El tercer y último paciente de este grupo, en el cual las titulaciones del anticuerpo anti-Sm fueron más altas que las del anticuerpo anti-DNA, presentó nefropatía tipo IV con estabilización de ésta posterior al uso de esteroides e inmunosupresores. En ningún paciente se documentó el viraje o presencia de anti-RNP y siempre hubo una correlación independiente con la presencia de los anticuerpos anti-DNA. La coincidencia de anticuerpos anti-DNA y anti-Sm ha sido poco estudiada, algunos autores los han referido en estudios transversales y no se ha establecido claramente su significancia clínica. (6)

En nuestro estudio, con un seguimiento longitudinal, se encontraon 6 pacientes con la aparición simultánea de autoanticuerpos anti-DNAn y anti-Sm con 2 comportamientos:

- 1) Elevación concomitante de anti-DNAn y anti-Sm y su descenso paralelo al seguimiento.
- 2) Elevación independiente de los anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm y coincidencia en su descenso.

En estudios anteriores se describe la elevación independiente de anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm (14). La producción de anticuerpos anti-DNAn parece ser dependiente de la activación policlonal de las células B y la síntesis de anti-Sm mediante un mecanismo T dependiente.

Entre las alteraciones inmunológicas fundamentales del LEG se encuentra la hiperreactividad de las células B, la cual se ha correlacionado con la fase de actividad. En el caso de la producción de autoanticuerpos anti-DNAn esta podría depender de una actividad policlonal la cual explicaría las fluctuaciones en diversas etapas del padecimiento (3)

En cuanto a la presencia de los anticuerpos anti-Sm se ha descrito una persistencia de los niveles de éste, así como mínimos cambios de sus títulos posterior al tratamiento. Además no parece haber relación con el periodo de exacerbación y/o remisión respectivamente (23) todo esto podría depender de la regulación que las células T tienen sobre la produc-

ción de este anticuerpo. Las manifestaciones clínicas predominantes en nuestros 2 grupos de pacientes con presencia de anticuerpos anti-DNAn y anti-Sm fueron:

Primer Grupo: Daño renal; nefropatía tipo IV (clasificación OMS), manifestaciones articulares (artritis).

Segundo Grupo: 2 pacientes con nefropatía tipo IV (clasificación de la OMS), 1 paciente con nefropatía tipo II, serositis (ascitis y derrame pleural), manifestaciones mucocutáneas.

La presencia de 2 o más anticuerpos tal como hemos hallado no es excepcional (26). Previamente se ha establecido la presencia de anticuerpos anti-DNAn, anti-DNAd, anticardiolipina y antivimetina en suero de pacientes con LEG activo o bien la coincidencia de anticuerpos anti-Sm y RNPn (12-32-33-34-35), como anticuerpos anti-SSA/Ro y SSB/La. (36)

Esto puede deberse a la similitud antigénica de los sistemas referidos por ejemplo grupos fosfato en el DNAn y DNAd, ribonucleoproteínas comunes en los sistemas RNPn-Sm y SSA/Ro SSA/La. (37-38). En cambio es claro que los determinantes antigénicos del Sm y DNAn son completamente diferentes, ya que la estructura antigénica del Sm está constituida por ribonucleoproteínas (39), el DNAn por nucleótidos y grupos fosfato (40)

Todo ello hace interesante el hallazgo de 2 anticuerpos en pacientes con LEG, puesto que no parece ser sólo un dato serológico más. La coincidencia de 2 anticuerpos puede ser debida a una clona de células B estimulada por 2 antígenos diferentes o derivar de 2 clones autoreactivas con precursores diferentes. (23)

Hasta al fecha algunas clonas de células B como las CD5 + parecen tener una potencialidad autorreactiva, principalmente cuando se analizan las síntesis de FR. Esto último y la identidad entre el idiotipo 16/6 en producción de anticuerpos anti-DNA_n y otros autoanticuerpos supone la existencia (22) de una sola clona autoreactiva, pero no podemos excluir la existencia de 2 estímulos antigénicos en la activación inmune, o bien mecanismos de control diferentes en una sola clona con la producción de al menos 2 autoanticuerpos.

CONCLUSIONES

- 1) Demostramos que en el estudio longitudinal existe una variación de títulos de anticuerpos anti-DNA_n y anti-Sm.
- 2) Que este comportamiento sigue al menos 2 perfiles: el paralelismo de anti-DNA_n y anti-Sm y la relación independiente de estos autoanticuerpos.
- 3) Que esta variación coincide en ocasiones con fases de actividad y/o remisión.
- 4) Nuestros hallazgos en estos pacientes estudiados sostienen evidencias previas de la interacción independiente de los anticuerpos anti-DNA_n y anti-Sm.
- 5) Pone de relieve la trascendencia del estudio en las secuencias de autoanticuerpos en LEG
- 6) Abre nuevas opciones estudios referentes al comportamiento clínico, serológico y de tratamiento de enfermedad autoinmune.

FIGURA- 1

FRECUENCIA DE LOS AAN EN EL LEG

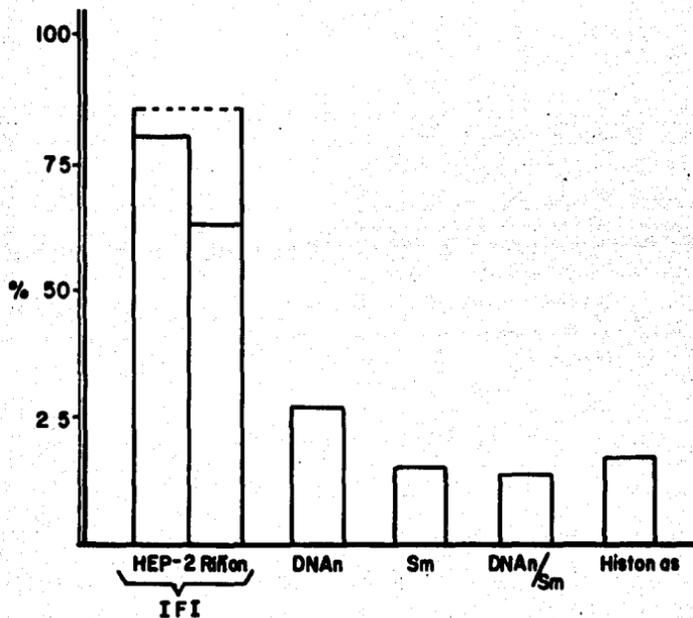


FIGURA.- 2

ACT: ACTIVIDAD
I : INACTIVIDAD
MESES DE ESTUDIO:

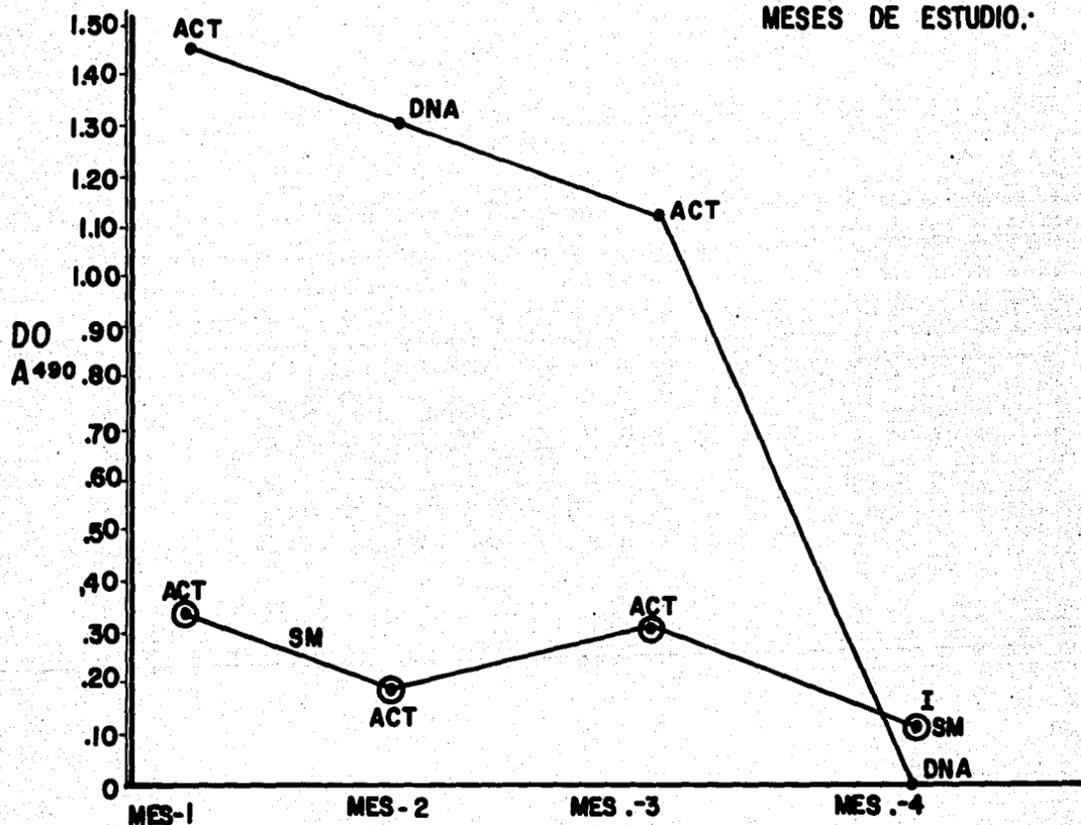
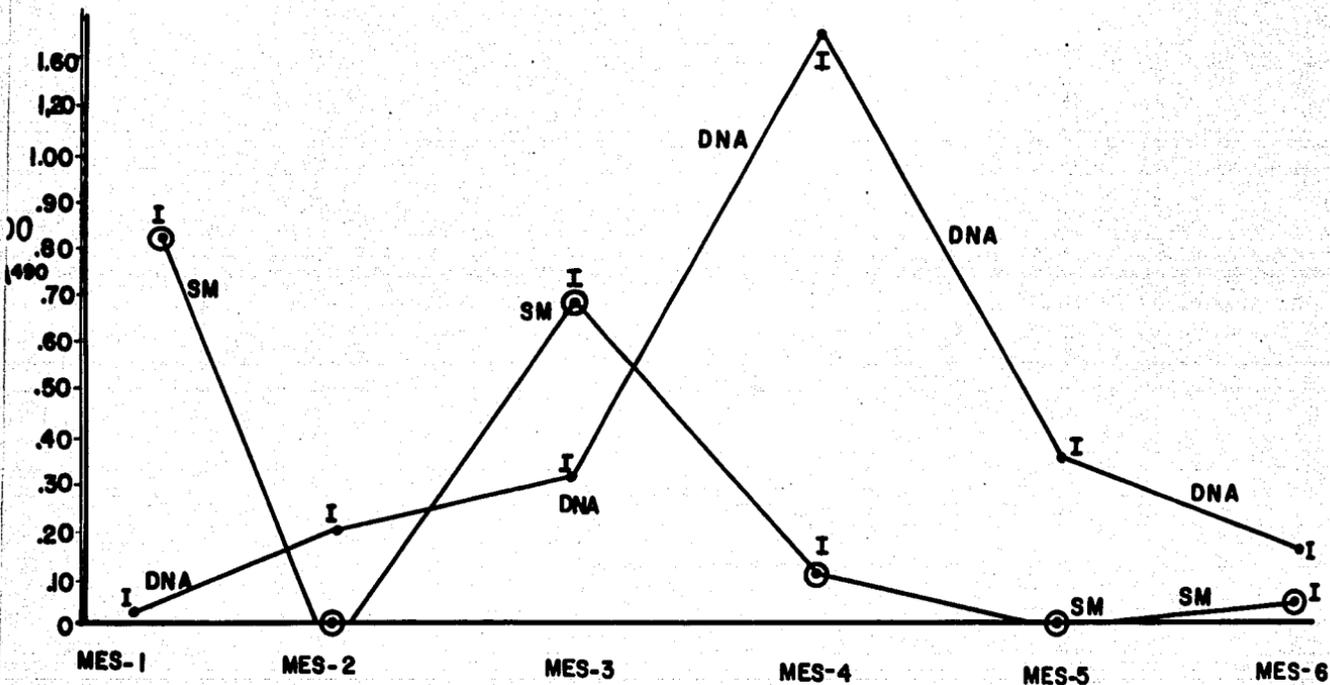


FIGURA.- 3

ACT: ACTIVIDAD
I : INACTIVIDAD.
MESES DE ESTUDIO.



BIBLIOGRAFIA

- 1 Frio, G.J.: Clinical aplication of lupus serum necleo-protein reaction using fluorescent antibody technique. J. Clin. Invest., 1957;36:890.
- 2 Locher JD, Medof ME, Bennet RM et al: Characterizacion of DNA used to assay for anti-DNA antibodies: Determi-nacion of the specificities of anti-DNA antibodies in SLE and non-SLE rheumatic diseases states. J. Immunolo-gy, 1977;118:694.
- 3 Borg EJ, Horst G, Hummel EJ. et al: Measurement of en-creases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism, 1990;33:5.
- 4 Davis P, Russell AS, Percey JS: A comparative study of technique for the detection of antibodies to native DNA. Am J Clin Pathol, 1977;67:374.
- 5 Davis P, Christian B, Russell AS: Immunofluorescent - technique for the detection of antibodies ton DNA, com-parison with radioi~~m~~unoassay J. Rheumatol, 1977;4:15.
- 6 Petri Michelle, Rheinschmidt Margaret, Whiting-Okeefe, Quinn et al: The frecuency of lupus anticoagulant in - Systemic Lupus Erythematosus. Annals of internal Medi-cine, 1987;106:524-531.

- 7 Alarcón-Segovia Donato, Delezé Margarita, Oria V. Carmen et al: antiphospholipid antibodies and the Antiphospholipid Syndrome in Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine*, 1989;68:353-365.
- 8 Alarcón Segovia Donato, Cardiel Mario H, y Reyes Edgardo: Antiphospholipid Arterial Vasculopathy. *The Journal of Rheumatology*, 1989;16:762-767.
- 9 Gershwin ME, Steinberg AD: Quantitative characteristics of anti-DNA antibodies in lupus nephritis. *Arthritis Rheumatism*, 1974;17:947.
- 10 André-Schwartz J, Datta SK, Shoenfeld Y, et al: Binding of cytoskeletal proteins by monoclonal anti-DNA lupus autoantibodies. *Clin Immunol Immunopathol*, 1948;31:261.
- 11 Sharp GF, Irvin WS, May CM et al: Association of autoantibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective tissue disease, Systemic Lupus Erythematosus and other rheumatic diseases. *N. Engl J Med*, 1976;295:1149.
- 12 Fisher DE, Reeves VAM, Swaak TJG: Is cardiolipin activity a cross reaction of anti DNA or a separate entity. *Arthritis and Rheumatism*, 1985;28:1348.
- 13 Nakamura RM, Tan EM: Recent progression in the study of autoantibodies to nuclear antigen. *Human Pathology*, 1978; 83:404.

- 14 Notman DD, Kurata N, Tan EM: Profiles of antinuclear - antibodies in systemic rheumatic diseases. An intern - Med, 1975;83:404.
- 15 Mmcarty GALE, Rice JOHN, Bembe MARY L et al: Independ- ent Expression of autoantibodies in Systemic Lupus - Erythematosus. The Journal of Rheumatology, 1982;9:5.
- 16 Borg E.J., Horts G, Hummel E. et al: Sequential deve- lopment of antibodies to specific Sm polipeptidos in a patient with systemic Lupus Erythematosus: Evidence - for independent regulation of anti double st randed - DNA and anti-Sm antibody production. Arthritis and Rheu- matism, 1988;31:12.
- 17 Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA):Their immunobiology and medicine. Adv Immunol, 1982;33:167.
- 18 Lockshi MD, Druzin ML, Goei S, et al: Antibody to Car- diolipin as a predictor of fetal distress or death in preganat patients with systemic lupus erythematosus. - New England Journal Med, 1985;313:152.
- 19 Lockshin MD, Harpel PC, Druzin ML et al: Lupus Pregnan- cy II. Unusial pattern of hipocomplementemia and trom- bocitopenia in the pregnant patient. Arthritis Rheum, 1985;269:591.
- 20 Harter JG, Reddy WJ, and Thorn MG: Studies on inter-- mittent corticosteroid dosage regimen.

- N. Engl. Med, 1963;269:591.
- 21 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al: The 1982 criteria - for the classification of systemic lupus erithematosus Arthritis Rheum, 1982;25:1271-1277.
 - 22 Kaburaki J, Stoller BD,: Identificación de anti-DNA - humano, anti-RPN y anti-Sm y anti SSA serum antibodies beering the cross reactions 16/6 idiotipo. J. Immunol, 1987;139:835.
 - 23 Pisetsky DS, Hoch SO, Katt CL et al. Specificity and - idiotypic analysis of a monoclonal anti-Sm antibody - with anti-DNA activity. J. Immunol Meth, 1983;63:359-366.
 - 24 Rubin RL, Joslin FG, Tan EM. An improved ELISA for na- tive DNA by elimination of interference by histone an- ti-bodies. J. Immunol Meth, 1983;63:359-366.
 - 25 Tan EM, Heenkel HG.: Characteristic of a soluble nu- clear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J. Immunology, 1966;96: 464-471.
 - 26 Isenberg DA, Shoenfield Y, Schwaris RJ: Multiple sero- logic reactions and their relationship to clinical ac- tivity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheu- matism, 1984;27:123-138.

- 27 Schawartz RS, Stollar BD: Origins of anti-DNA auto-antibodies J. Clin. Invest, 1985;25:1271-1277.
- 28 Cameron JS, Lessof MH, Ogg CS. et al: Disease activity in the nephritis of SLE in relation to serum complement concentrations DNA-binding capacity and precipitating anti-DNA antibody. Clin Exp Immunol, 1976;25:418-427.
- 29 Appel AE, Sablay LB, Golden RA, et al: The effect of normalization of serum complement and anti-DNA antibody on the course of lupus nephritis. Am. J. Med, 1978; 64:274-283.
- 30 Pisetsky David S, Grudter Jane P, Gilkeson Gary S: A role for immunogenic DNA in the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism, 1990;33:153-159.
- 31 Zhau Li, Steinman Charles: Plasma DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism. 1989;32: 6:726-732.
- 32 Subiza JL, Caturla A, Pacual Salcedo D. et al: DNA anti DNA complexes account for part of the antihistone activity found in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism, 1989;32:4.
- 33 Stollar BD, Zon G, Pastor RW: A recognition site in synthetic heliacal oligonucleotides for monoclonal anti

- 34 Pisetsky DS, Mccarthy GA, Peters DU: Mechanism of auto antibody production in autoimmune MRL mice J. Experimental Med, 1980;152:1302-1310.
- 35 Smeeck RT, Lucassen VAM, Swaak TJG: Is cardiolipin activity a cross reaction of anti-DNA or a separate entity. Arthritis and Rheumatism; 1987;30:607-617.
- 36 Mond Chaim B, Peterson Margaret GE, Rothfield NAUM P. Correlation of anti-Ro antibody with photosensitivity - rash in Systemic Lupus Erythematosus patients. Arthritis and Rheumatism; 1989;32:2202-2204
- 37 Clark G, Reichlin M, Tomasi TB: Characterization of a soluble cytoplasmatic antigen reactive with sera from patient with systemic lupus erythematosus. J. Immunology; 1969;102:117.
- 38 Montecucco Carlo Maurizio, Caporali Roberto, Negri - Claudia et al: Antibodies from patients with Rheumatoid Arthritis and systemic lupus erythematosus recognize different epitopes of a single heterogeneous nuclear RNP core protein. Arthritis and Rheumatism, - 1990;33:3.
- 39 Tan EM, Fritzler MJ, Mccdugal JS et al: Reference sera for antinuclear antibodies. Antibodies to native DNA, Sm, nuclear RNP, and SSB-La. Arthritis and Rheumatism; 1982;25:1003.

40 Ohlendorf DH, Matthews BW: Structural studies of protein-nucleic acid interactions. Ann Rev Biophys Bioeng N. Engl J Med.; 1976;295:1149.