

BIBLIOTECA UCM



5301689263

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI-
RIBONUCLEOPROTEINA (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP, P0, P1 Y P2) Y ANTI-
LAMININA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y EN
INFESTACIONES POR PARASITOS.

TESIS DOCTORAL
JOSE GERARDO GARCIA LERMA

1995

V. B
Julia Leguía



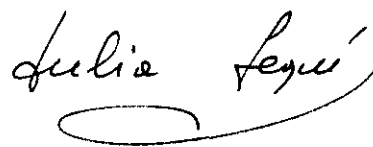
R. 24392

Gerardo L.

La Dra. **Julia Sequí Navarro**, Jefe de Sección de Inmunología del Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva , Instituto de Salud Carlos III, certifica:

que José Gerardo García Lerma, con DNI 50841510 y licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo “Estudio de la respuesta de anticuerpos anti-ribonucleoproteína (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP, P0, P1 y P2) y anti-laminina en pacientes con lupus eritematoso sistémico y en infestaciones por parásitos”. Y para que así conste, y a efectos de la presentación del mismo para optar al Título de Doctor, firmo la presente certificación.

Madrid, 11 de Mayo de 1995

A handwritten signature in black ink, reading "Julia Sequí". The signature is written in a cursive style with a large, sweeping underline that loops back under the name.

Fdo. Julia Sequí Navarro

Jefe de Sección de Inmunología

Centro Nacional de Investigación Clínica

Instituto de Salud Carlos III

A mi novia Nieves

A mis padres y hermanos

A mi tío Deogracias (in memoriam)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Julia Sequí Navarro, por su enorme calidad humana y científica que me ha permitido superar los momentos más difíciles.

A María Jesús Ramos por hacer que el trabajo en el laboratorio haya sido un placer y por el apoyo incondicional prestado durante todos estos años.

Al Dr. Ignacio Moneo cuya capacidad crítica y aportación científica y humana ha sido determinante en muchos momentos.

Al Dr. Miguel González Muñoz, por la discusión de resultados y ayuda científica y humana.

A todos los compañeros del laboratorio de Inmunología: Luisa, Laura, Gloria y Sonsoles por haberme prestado su ayuda desinteresada siempre que lo he solicitado.

A la Dra. Mónica Fernández por la gran ayuda prestada en la parte final de ésta Tesis.

A Isabel Sanchidrian, persona a la que debo mucho desde mis comienzos en la Inmunología.

Al Dr. José Luis Rodríguez y a la Dra. Carmen Gelpí por la discusión de resultados y el apoyo técnico prestado en los estudios de inmunopecipitación de ARN.

A la Dra. Carmen Vela por su ayuda en la discusión de resultados y en la lectura crítica de parte de esta Tesis.

A la Dra. Matilde Salinas por la ayuda prestada en la purificación de ribosomas.

A los Dres. Sabino Puente y Margarita Baquero por el aporte de sueros de pacientes parasitados y el examen parasitológico de los mismos.

Al Dr. Antonio Zea por su aporte de sueros de pacientes con LES

Al Dr. Manuel Ortiz de Landázuri por su ayuda en la puesta a punto del ensayo de adhesión celular y al Dr. A. Sonnenberg por proporcionarnos el anticuerpo monoclonal GoH3.

A todos los compañeros del CIC que me han ayudado desinteresadamente siempre que lo he requerido.

INDICE

ABREVIATURAS

1.-	INTRODUCCION.	1
	1.1- Autoanticuerpos anti-ribonucleoproteína (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP, P0, P1 y P2) en pacientes con LES.	3
	1.2- Anticuerpos dirigidos a componentes de matriz extracelular en pacientes con LES.	10
	1.3- Autoanticuerpos e infestaciones por parásitos. Relación con la respuesta de autoanticuerpos característica de pacientes con LES.	13
2.-	OBJETIVOS.	17
3.-	MATERIALES Y METODOS.	19
	I- Materiales.	20
	1. Sueros.	20
	2. Anticuerpos.	22
	3. Fuentes de antígenos empleadas.	23
	4. Aparataje y materiales.	24
	5. Reactivos.	25
	II- Métodos.	27
	1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).	27
	2. Preparación del extracto de timo de conejo para la detección de autoanticuerpos anti La/SSB, Sm y U1 RNP.	27
	3. Preparación del extracto de bazo humano para la detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA.	28
	4. Obtención de ribosomas purificados de hígado y cerebro de rata adulta	

para la detección de autoanticuerpos anti-ribosomales (fosfoproteínas P0, P1 y P2).	28
5. Análisis de la pureza de la preparación de laminina (LMN) de sarcoma murino.	29
6. Detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP por “Western blot”.	29
7. Detección de autoanticuerpos anti-ribosomales por “Western blot”.	30
8. Detección de anticuerpos anti-LMN por “Western blot”.	30
9. Análisis de la actividad anti-LMN por “Dot blot”.	31
10. Renaturalización de LMN y fosfoproteínas ribosomales.	31
11. Inmunoprecipitación de extractos marcados de células HeLa.	31
12. Detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP por ELISA indirecto con autoantígenos recombinantes.	31
13. Detección de anticuerpos anti-LMN por ELISA indirecto.	32
14. Detección de anticuerpos anti-ADN de hélice sencilla por ELISA indirecto.	32
15. Purificación de IgG por columna de proteína G-sefarosa.	33
16. Oxidación de carbohidratos de LMN.	34
17. ELISA competitivo con LMN, LMN desnaturalizada por calor, y FN.	34
18. Ensayo de inhibición de adhesión de células U937 a LMN.	34
19. Metodología estadística.	35
4- . RESULTADOS.	37
1-. Análisis de la presencia de anticuerpos anti-nucleares, anti-citoplasma y anti-matriz extracelular en el suero de pacientes parasitados por Inmunofluorescencia Indirecta.	38

II-. Estudio comparativo de la respuesta de autoanticuerpos anti-ribonucleoproteína (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP, P0, P1 y P2) en pacientes parasitados, LES y población normal.	43
1-. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP en pacientes parasitados por ELISA con autoantígenos recombinantes.	43
2-. Caracterización por “Western blot” de la respuesta de autoanticuerpos anti-RNP en pacientes con LES.	45
2.A- Autoanticuerpos anti-ribosomales.	45
2.B- Autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm y U1RNP.	46
2.C- Autoanticuerpos anti-Ro/SSA.	48
3-. Análisis de la respuesta de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1RNP por ELISA con autoantígenos recombinantes en pacientes con LES y población normal. Correlación con la técnica de “Western blot”.	48
4-. Análisis de la respuesta de autoanticuerpos anti-RNP por “Western blot” e inmunoprecipitación de ARN en pacientes parasitados.	50
III-. Estudio comparativo de la respuesta a laminina (LMN) en pacientes parasitados (filariasis), LES y población normal.	55
1-. Análisis de la pureza de la preparación de LMN.	55
2-. Análisis de la respuesta de anticuerpos anti-LMN de clase IgG por ELISA en filariasis, pacientes con LES y población normal.	56
3-. Estudio comparativo de la capacidad de unión de IgG anti-LMN en filariasis y en pacientes con LES.	57
4-. Capacidad de los anticuerpos anti-LMN de reconocer LMN sometida a diferentes tratamientos desnaturalizantes y renaturalizantes.	62

5-. Reactividad frente a componentes de matriz extracelular por Inmunofluorescencia Indirecta.	65
6-. Análisis de la correlación entre los niveles de anticuerpos anti-LMN y autoanticuerpos anti-ADN de hélice sencilla.	68
7-. Capacidad de los anticuerpos anti-LMN de inhibir la adhesión de células U937 a pocillos preincubados con LMN.	69
5-. DISCUSION.	72
6-. CONCLUSIONES.	88
7-. BIBLIOGRAFIA.	91
8-. ANEXO: Publicaciones	

ABREVIATURAS

AAN: anticuerpos antinucleares.

BCIP: 5,Br-4-cloro-3-indolil fosfato.

BSA: albúmina de suero bovino.

DO: densidad óptica.

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.

ELISA: ensayo de Inmunoabsorbente unido a enzima.

EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

FA: fosfatasa alcalina.

FN: fibronectina.

IFI: inmunofluorescencia Indirecta.

Kd: kilodalton.

LES: lupus eritematoso sistémico.

LMN: laminina.

LMN EHS: laminina de tumor murino Engelbreth Holm Swarm.

MEC: matriz extracelular.

NBT: nitroazul tetrazolio.

NP-40: nonidet P-40.

PBS: tampón fosfato salino.

PMA: forbol miristato acetato.

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro.

pNFF: para-nitrofenil fosfato.

RNP: ribonucleoprotéicas, partículas.

SDS: dodecil sulfato sódico.

snRNP: ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, partículas.

SS: síndrome de Sjögren.

TBS: tampón Tris salino.

TBS-BSA: TBS con albúmina de suero bovino.

TBS-BSA-Tw: TBS-BSA con Tween-20.

Tw: Tween-20.

INTRODUCCION

El suero de pacientes con enfermedades autoinmunes se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos a antígenos propios. La naturaleza y localización de los autoantígenos reconocidos es muy variada pudiendo ser desde receptores celulares, hormonas e inmunoglobulinas, hasta componentes de matriz extracelular, citoplasma y núcleo (Bottazo *et al.*, 1986; Henney, 1969; Moreland *et al.*, 1991; Fritzer & Salazar, 1991).

Dentro del amplio espectro de enfermedades autoinmunes, el lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad sistémica de origen desconocido que se caracteriza por la afectación de multitud de órganos. Las características clínicas observadas en pacientes con LES son muy variadas e incluyen manifestaciones cutáneas, musculoesqueléticas, hematológicas y renales entre otras (Harrison, 1991). Aunque la prevalencia de esta enfermedad varía según los autores y la población de estudio, se ha encontrado que afecta más a mujeres que a hombres, y que es más común en personas de raza negra que en blancos (Ferrell & Tan, 1985).

Además de las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes con LES, una de las características principales de esta enfermedad es la detección en suero y a títulos altos, de autoanticuerpos dirigidos frente a una gran variedad de autoantígenos (Tan, 1989). Entre éstos se incluyen ADN, histonas, fosfolípidos como la cardiolipina, componentes de matriz extracelular, ribosomas, polipéptidos Ro/SSA y La/SSB, y partículas ribonucleoprotéicas pequeñas de la serie U definidas por su reactividad con autoanticuerpos anti-Sm y anti-U1 RNP (Pisetsky, 1992; Monestier & Kotzin, 1992; Love & Santoro, 1990; Moreland *et al.*, 1991; Fritzer & Salazar, 1991).

El análisis de esta respuesta de autoanticuerpos es de gran utilidad en el diagnóstico, aceptándose actualmente que su presencia es marcador de una patología autoinmune concreta y/o es de interés pronóstico (Tan, 1989; Tsokos *et al.*, 1987). Así, la existencia de autoanticuerpos anti-Sm es uno de los criterios aceptados por la Sociedad Americana de Reumatología para el diagnóstico de LES (Tan *et al.*, 1982). Además, se sabe que la presencia de autoanticuerpos anti-cardiolipina se correlaciona con el riesgo de padecer trombosis, trombocitopenia y abortos recurrentes (Love & Santoro, 1990), que los autoanticuerpos anti-ribosomales se asocian con psicosis lúpica (Bonfa *et al.*, 1987), y que

títulos altos de autoanticuerpos anti-ADN correlacionan con enfermedad renal en LES (Feldman *et al.*, 1982; Tan, 1989).

1-. Autoanticuerpos anti-ribonucleoproteína (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP, P0, P1 y P2) en pacientes con LES.

Entre los autoanticuerpos producidos por pacientes con LES, los más característicos son aquellos que reconocen componentes del núcleo o citoplasma celular y que se detectan en casi la totalidad de los pacientes. Dentro de esta respuesta se encuentra la dirigida a autoantígenos cuya característica común es su naturaleza ribonucleoprotéica (RNP). Estas partículas RNP están formadas por polipéptidos de peso molecular variable asociados a ARN de distintos tamaños y son Ro/SSA, La/SSB, ribosomas, y ribonucleoproteínas nucleares pequeñas de la serie U (snRNP) (Tabla I).

Los autoanticuerpos anti-Ro/SSA, identificados inicialmente en el suero de un paciente con LES sin anticuerpos antinucleares (AAN) y que aparecen también en pacientes con síndrome de Sjögren (SS) y síndromes clínicos como el lupus del neonato y el lupus cutáneo subagudo (Clark *et al.*, 1969; Alspaugh & Tan, 1975; Tsokos *et al.*, 1987), reconocen partículas RNP poco abundantes (aproximadamente 10^5 copias por célula) localizadas en el núcleo, aunque actualmente esta localización aún está sujeta a controversia (Boire & Craft, 1989). El principal componente del sistema Ro/SSA-anti-Ro/SSA, es un polipéptido ácido de 60 Kd asociado a ARN de la serie Y denominados h (humano)Y1, hY3, hY4 y hY5 (Yamagata *et al.*, 1984). Además de este polipéptido, el análisis de lisados crudos de linfocitos y eritrocitos ha permitido identificar una proteína adicional de 52 Kd (linfocitos) y otra de 54 Kd (eritrocitos) (Rader *et al.*, 1989). Estudios recientes sugieren la existencia de un polipéptido adicional de 46 Kd (calreticulina), aunque su asociación con el sistema Ro/SSA-anti-Ro/SSA aun está sujeta a controversia (McCauliffe *et al.*, 1990a; Rokeach *et al.*, 1991). El análisis de la reactividad anti-Ro/SSA en pacientes con LES y SS, ha indicado que aunque la mayoría

de los sueros reconocen los polipéptidos de 52 y 60 Kd simultáneamente, la reactividad exclusiva frente a la forma de 52 Kd se limita a pacientes con SS, y la dirigida sólo a la forma de 60 Kd aparece en pacientes con LES (Ben-Chetrit *et al.*, 1990).

TABLA I. Localización y características de los autoantígenos ribonucleoprotéicos (RNP) reconocidos por pacientes con LES.

AUTOANTIGENO	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS MOLECULARES
Ro/SSA	¿Citoplásmica?	Polipéptidos de 60, 52, 54 y 48 Kd (calreticulina)* asociados a ARN de la serie Y (hY1, hY3, hY4 y hY5).
La/SSB	Nuclear	Polipéptido de 47,5 Kd asociado a transcritos recién sintetizados por la ARN polimerasa III (4,5S ARN, 5S ARN, Y5 ARN y U1 ARN entre otros).
Sm	Nuclear	Polipéptidos B' (29), B (28), D (16), E (12), F (11) y G (9 Kd) asociados a U1, U2, U5 y U4/U6 ARN.
U1 RNP	Nuclear	Polipéptidos A(33), C (22) y de 70 Kd asociados a U1 ARN.
RNP ribosomales	Citoplásmica	Fosfoproteínas P0 (38), P1 (19) y P2 (17 Kd) de la subunidad grande del ribosoma.

*La relación de la calreticulina con el sistema Ro/SSA está todavía sujeta a controversia.

Los autoanticuerpos anti-La/SSB identificados por primera vez en el suero de un paciente con LES y que se detectan también en pacientes con SS (Mattioli & Reichlin, 1974; Alspaugh & Tan, 1975), reconocen una fosfoproteína muy conservada de la que se han descrito al menos ocho isoformas relacionadas con el grado de fosforilación (Francoeur *et al.*, 1985a). La localización de este autoantígeno es nuclear existiendo aproximadamente 10^6 copias por célula de mamífero (Stefano,

1984). El peso molecular de La/SSB oscila entre 45 y 50 Kd dependiendo del origen, y está formada por dos dominios asimétricos en la distribución de aminoácidos y resistentes a la acción de determinadas proteasas (Chan *et al.*, 1986). Los ARN a los que se asocia este polipéptido incluyen precursores de 5S ARN, U1 ARN, 4.5S ARN, 7S ARN, 7.2S ARN, Y5 ARN y algunos ARN codificados por virus como EBER 1 y 2 de Epstein Barr, y VA-ARN I y VA-ARN II de adenovirus entre otros (Mathews & Francoeur, 1984). La fosfoproteína La/SSB se ha encontrado asociada al menos transitoriamente a Ro/SSA en las partículas Ro hY5 (Boire & Craft, 1990).

Los autoanticuerpos anti-Sm y anti-U1RNP (denominado este último también anti-Mo) se detectan en un elevado porcentaje de pacientes con LES (Tan & Kunkel, 1966; Mattioli & Reichlin 1971), aunque los anti-U1 RNP aparecen también a títulos altos en la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC), una entidad caracterizada por la combinación de síndromes clínicos semejantes al LES, esclerodermia, polimiositis y artritis reumatoide, y que se define serológicamente por la elevada frecuencia de aparición de estos autoanticuerpos (Habets *et al.*, 1983). El autoantígeno reconocido consiste en partículas snRNP presentes en el núcleo de todas las células eucariotas, y que están formadas por una serie de polipéptidos de peso molecular variable asociados a ARN de la serie U definidos así por su alto contenido en uracilo (Busch *et al.*, 1982; Sharp, 1987). Las partículas snRNP más abundantes son U1, U2, U5 y U4/U6, estimándose que existen alrededor de 2^5 copias de U5 y U4/U6, y 10^6 copias de U1 y U2 por célula de mamífero (Craft, 1992) Mientras que los anticuerpos anti-Sm precipitan U1, U2, U5 y U4/U6, los anti-U1 RNP sólo precipitan U1 (Lerner *et al.*, 1982). La aplicación de técnicas de "Western blot" ha permitido analizar tanto los polipéptidos reconocidos, como los patrones de reactividad de sueros autoinmunes. Actualmente se acepta la existencia de una serie de polipéptidos comunes conocidos como proteínas del "core", y que en humanos se denominan B' (29 Kd), B (28 Kd), D (16 Kd), E (12 Kd), F (11 Kd) y G (9 Kd). Además de estas proteínas comunes, algunas partículas snRNP contienen polipéptidos exclusivos que las caracterizan. Así, U1 RNP incluye los polipéptidos A (33 Kd), C (22 Kd) y 70 Kd, y U2

RNP las proteínas A' (31 Kd) y B" (26.5 Kd) (Lerner *et al.*, 1982; Conner *et al.*, 1982).

Mientras que los anticuerpos anti-Sm reconocen las proteínas B', B, D, E, F y G comunes a todas estas partículas (principalmente reaccionan con B'/B y D), los polipéptidos exclusivos de un tipo de partícula snRNP también son reconocidos por sueros autoinmunes. Así, los anticuerpos anti-U1 RNP, aunque reconocen débilmente B'/B, reaccionan preferentemente con las proteínas A, C y 70 Kd exclusivas de U1, mientras que anticuerpos anti-U2 RNP reaccionan con los polipéptidos A' y B" de U2 RNP (Habets *et al.*, 1985; Craft, 1992).

Los autoanticuerpos anti-ribosomales detectados en aproximadamente el 12% de pacientes con LES, reconocen tres fosfoproteínas ácidas que forman parte de la subunidad grande del ribosoma y que se denominan P0 (38 Kd), P1 (19 Kd) y P2 (17 Kd), habiéndose descrito una asociación entre la presencia de estos autoanticuerpos y psicosis lúpica (Elkon *et al.*, 1985; Bonfa *et al.*, 1987; Derksen *et al.*, 1990).

Estos autoantígenos poseen **funciones muy conservadas** y vitales para los procesos celulares. Así, las partículas snRNP reconocidas por autoanticuerpos anti-Sm y anti-U1 RNP, se organizan en un complejo macromolecular denominado cuerpo de procesamiento que participa en la eliminación de intrones y posterior religamiento de exones en transcritos recién sintetizados de ARN o pre-ARNm (Sharp, 1987). Así, se ha comprobado que este mecanismo se puede inhibir por medio de sueros con actividades anti-Sm o anti-U1RNP (Lerner *et al.*, 1982). Como cabría esperar por su papel activo en el procesamiento de pre-ARNm, tanto el componente protéico como los U ARNs se encuentran muy conservados (Craft, 1992; Busch *et al.*, 1982). Estudios de inmunoprecipitación han demostrado que los antisueros anti-Sm y anti-U1RNP precipitan partículas snRNP tanto de humano, ratón o pollo como de insectos o protozoos (Francoeur *et al.*, 1985b; Lerner *et al.*, 1982; Rokeach *et al.*, 1989).

El polipéptido La/SSB se piensa que puede estar implicado en la transcripción mediada por la ARN polimerasa III actuando como cofactor (Keene, 1989; Whittingham *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 1989).

Las funciones de Ro/SSA no están tan claras, aunque su asociación con La/SSB en partículas RNP sugiere que pueda intervenir también en este proceso (Boire & Craft, 1990; Deutscher *et al.*, 1988).

Los polipéptidos P0, P1 y P2 reconocidos por el subgrupo de pacientes con LES y psicosis están directamente implicados en la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que anticuerpos monoclonales anti-P dirigidos al extremo carboxilo terminal de estas fosfoproteínas, inhiben el paso de elongación de la síntesis de proteínas impidiendo la interacción del ribosoma con los factores de elongación EF-1 α y EF-2 (Uchiumi *et al.*, 1990).

Además de la participación en procesos celulares vitales, su secuenciación ha permitido identificar **características estructurales comunes** en muchos de ellos (Tabla II). Así, se han encontrado secuencias RNP consenso en La/SSB, polipéptidos A y de 70 Kd asociados a U1 RNP, y el polipéptido Ro/SSA de 60 Kd (Keene, 1989; Sillekens *et al.*, 1987; Query *et al.*, 1989; Deutscher *et al.*, 1988); motivos "Helix-turn-helix" en el polipéptido Ro/SSA de 48 Kd (McCauliffe *et al.*, 1990a); motivos "zinc-binding-finger" en los polipéptidos Ro/SSA de 60 y 52 Kd (Deutscher *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1991); motivos "leucine zipper" en el polipéptido Ro/SSA de 52 Kd (Chan *et al.*, 1991); y motivos PP/aPGMR/iPP en los polipéptidos B, B', A y C de snRNP (Ohosone *et al.*, 1989; Rokeach *et al.*, 1989; Sillekens *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1988). La existencia de estas características estructurales comunes, sugiere que la respuesta de autoanticuerpos anti-RNP encontrada en LES puede estar estrechamente relacionada entre sí.

Se sabe poco acerca del **origen de estos autoanticuerpos**. Algunos autores postulan que el estímulo inicial pueda originarse por expresión del autoantígeno nuclear o citoplásmico en membrana plasmática (Baboonian *et al.*, 1989; Koren *et al.*, 1992). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han encaminado a la búsqueda de homologías de secuencia con proteínas de virus, postulándose que una reactividad cruzada pueda ser la responsable de su aparición (Oldstone, 1989; Horsfall, 1992).

TABLA II. Características estructurales comunes identificadas en los autoantígenos ribonucleoprotéicos.

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES	AUTOANTIGENOS
Octámero RNP consenso	Ro/SSA 60 Kd, La/SSB, polipéptidos A y de 70 Kd asociados a U1 RNP y B" de U2 RNP.
Motivo zinc binding finger	Ro/SSA 60 Kd, Ro/SSA 52 Kd.
Motivo rico en prolina PP/aPGMR/iPP	Polipéptidos B, B', A y C de RNP pequeñas nucleares.

Así, se han identificado homologías de La/SSB con la poliproteína *gag* del virus del sarcoma felino (McNeilage *et al.*, 1992), Ro/SSA con la proteína N del virus de la estomatitis vesicular (Hardgrave *et al.*, 1993), B'/B con la proteína *gag* p24 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (Keyser *et al.*, 1992), y del polipéptido D de Sm con el antígeno nuclear de Epstein Barr EBNA-1 entre otros (Rokeach *et al.*, 1988).

Sin embargo, hay varias evidencias en contra de la hipótesis de homologías con secuencias víricas como responsable de la generación de autoanticuerpos anti-RNP en LES.

Una de ellas es que no se explica satisfactoriamente la respuesta a multitud de epítomos en un mismo autoantígeno (Habets *et al.*, 1990). El análisis de los autoepítomos reconocidos por los sueros ha permitido identificar multitud de determinantes antigénicos tanto lineales como conformacionales, que hacen difícil que una única reactividad cruzada pueda ser la responsable de la aparición de estos autoanticuerpos. De esta manera, se han descrito varios epítomos en La/SSB (Rauh *et al.*, 1988; St Clair *et al.*, 1988; McNeilage *et al.*, 1992), Ro/SSA (Boire *et al.*, 1991), el polipéptido A de U1 RNP (Habets *et al.*, 1990), y en fosfoproteínas ribosomales (Elkon *et al.*, 1986). Cuando esta respuesta es considerada como una entidad, la policlonalidad se refleja además en la gran diversidad de proteínas de secuencias no relacionadas que son antigénicas y específicas del LES (Gharavi *et al.*, 1988; Tan, 1989). Además, en algunos casos las regiones de homología forman parte de epítomos

conformacionales (McNeilage *et al.*, 1992), mientras que en otros la reactividad encontrada frente a la secuencia homóloga en la proteína vírica ha sido muy débil, no encontrándose además correlaciones entre infecciones por el virus en cuestión e incidencias del LES (Routsias *et al.*, 1994).

La aparición de autoanticuerpos como consecuencia de reactividades cruzadas con polipéptidos no relacionados, parece más fácil de entender en aquellos casos en los que se reconoce un único antígeno (Tan, 1989). Una de las demostraciones experimentales más convincentes que implica a fenómenos de mimetismo molecular en la aparición de autoanticuerpos lo constituye la respuesta a la proteína básica de la mielina. En éste caso, se ha identificado una homología de 6 aminoácidos entre la región encefalitogénica de ésta proteína y la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B, habiéndose comprobado que la inmunización de conejos con péptidos víricos origina no sólo respuesta de autoanticuerpos, sino además una lesión histológica (Horsfall, 1992).

No obstante, estudios recientes han permitido comprobar que la inmunización con partículas RNP extrañas intactas, la co-inmunización con partículas propias intactas y polipéptidos de RNP extraños, pero no la inmunización con partículas propias intactas, origina una diversificación de la respuesta frente a otros polipéptidos de la misma partícula (Fatenejad *et al.*, 1993; Fatenejad *et al.*, 1994). Este mecanismo no parecería estar en contradicción con la hipótesis de una única reactividad cruzada como responsable de la aparición de estos autoanticuerpos, ya que ésta podría originar el reconocimiento de otros polipéptidos de la misma partícula RNP debido a las homologías que éstos poseen entre sí (Ohsone *et al.*, 1989; Rokeach *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1988; Sillekens *et al.*, 1987).

Según este mecanismo, el mimetismo molecular entre secuencias de virus o agentes infecciosos en general y un polipéptido concreto de una partícula RNP, podría traer consigo el reconocimiento del autoantígeno del hospedador lo que a su vez podría originar una diversificación de la respuesta a otros polipéptidos de la misma o de distinta partícula RNP. De esta manera, el autoantígeno y la proteína del agente infeccioso deberían ser lo suficientemente homólogos para permitir la reactividad cruzada, y lo suficientemente distintos como para ser capaz de romper la tolerancia a lo propio (Oldstone, 1987).

2-. Anticuerpos dirigidos a componentes de matriz extracelular en pacientes con LES.

La matriz extracelular (MEC) es un entramado de macromoléculas que junto al componente celular constituye los tejidos. Aunque hasta hace poco tiempo se consideraba que el papel de esta matriz era simplemente mantener la estructura física del tejido, ahora se sabe que juega un papel crucial en la regulación de una serie de procesos biológicos como el desarrollo, migración, diferenciación y proliferación celular. Las macromoléculas que forman la MEC se agrupan en tres tipos fundamentales: proteoglicanos, colágenos, y glicoproteínas no colagenosas como laminina y fibronectina. Debido a que el LES se engloba dentro de las denominadas enfermedades del tejido conectivo, se han desarrollado numerosos estudios encaminados a analizar reactividades frente a estos componentes de MEC (Tabla III).

La *fibronectina* (FN) es una glicoproteína multidominio de aproximadamente 440 Kd compuesta por dos subunidades similares unidas entre sí por puentes disulfuro. Básicamente, las dos formas principales de FN, la FN plasmática y la FN celular o hística, difieren entre sí en que la segunda posee una secuencia tipo III adicional que la hace relativamente insoluble (Canonge, 1992). Recientemente se ha descrito la presencia de anticuerpos dirigidos a la forma soluble de FN en un alto porcentaje de pacientes con LES (29%) (Atta *et al.*, 1994a). Estos anticuerpos reconocen principalmente el dominio de 30 Kd implicado en la unión a colágeno, encontrándose que son capaces de inhibir la unión de colágeno tipo I a FN, así como de disminuir la adhesión de células a pocillos preincubados con esta glicoproteína (Atta *et al.*, 1994b). Los niveles de actividad anti-FN detectada en el suero de estos pacientes han sido bajos, habiéndose sugerido que pueda ser debido a la unión de los anticuerpos a FN soluble presente en la circulación (Atta *et al.*, 1994a).

TABLA III. Anticuerpos dirigidos a componentes de MEC en LES y modelos murinos de lupus.

COMPONENTE DE MEC	REFERENCIA
Fibronectina	
LES	Atta <i>et al.</i> , 1994a Atta <i>et al.</i> , 1994b
Colágenos tipos I, II, III, IV y V	
LES	Moreland <i>et al.</i> , 1991
Ratones MRL- <i>lpr</i>	Ratkay <i>et al.</i> , 1991
Glucosaminglucanos	
LES	Faaber <i>et al.</i> , 1984
Laminina	
Ratones MRL- <i>lpr</i>	Ratkay <i>et al.</i> , 1991
Enfermedad injerto frente a hospedador	Florquin <i>et al.</i> , 1991

Además de la presencia de anticuerpos anti-FN, algunos estudios han permitido identificar anticuerpos dirigidos a varios tipos de *colágenos* tanto en LES como en modelos murinos de esta enfermedad. Los colágenos constituyen una familia de proteínas de MEC de los que se conocen al menos doce tipos, y cuya característica principal es que forman una estructura rígida helicoidal constituida por tres cadenas α enrolladas entre sí formando una triple hélice (Darnell *et al.*, 1993).

En un estudio llevado a cabo con el fin de analizar la respuesta de anticuerpos anti-colágeno en pacientes con LES, se pudo demostrar que aproximadamente el 85% de enfermos reconocían colágeno tipo IV y el 70% colágeno tipo V (Moreland *et al.*, 1991). Además de esta respuesta mayoritaria, también se demostró reactividad frente a otros tipos de colágenos (tipos I, II y III) aunque no frente a laminina. Se ha postulado que la reactividad a colágeno tipo IV puede originarse por exposición de estas moléculas tras la destrucción del endotelio en pacientes con LES y vasculitis, mientras que la aparición de anticuerpos anti-colágeno tipo V podría relacionarse con el depósito de complejos inmunes DNA-anti-DNA en el mesangio que originaría el daño en éste y la exposición de epítomos de esta molécula. Estudios independientes realizados con ratones MRL-*lpr*, han indicado

que la respuesta dirigida a un tipo de colágeno en particular es inhibible por otros colágenos, indicando que la población de anticuerpos detectada es similar (Ratkay *et al.*, 1991). Esto se ha explicado porque la respuesta está dirigida principalmente a epítomos de la porción helicoidal de moléculas nativas compartidas por muchos tipos de colágenos.

Otros componentes de MEC frente a los que se han detectado anticuerpos en pacientes con LES lo constituyen los **glucosaminglucanos**, concretamente el condroitín sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico (Pisetsky, 1992). Se ha demostrado que los niveles de anticuerpos dirigidos a estos constituyentes de proteoglicanos correlacionan con los títulos de autoanticuerpos anti-ADN, encontrándose además que autoanticuerpos anti-ADN purificados son capaces de reconocer ácido hialurónico (Faaber *et al.*, 1984). Esta reactividad cruzada se ha relacionado con la capacidad que poseen algunos anticuerpos anti-ADN de baja afinidad de reconocer estructuras repetitivas cargadas negativamente distintas de ADN (Isenberg & Shoenfeld, 1987; Naparstek & Plotz, 1993).

Aunque en algunos estudios no se ha detectado la existencia de anticuerpos anti-**laminina** (LMN) en LES humano (Moreland *et al.*, 1991), sí se han descrito en modelos experimentales de lupus así como en la enfermedad injerto frente a hospedador, donde además se han implicado directamente en la inmunopatología renal (Ratkay *et al.*, 1991; Florquin *et al.*, 1991). Estos anticuerpos han sido detectados también en pacientes con esclerodermia y fenómeno de Raynaud (Gabrielli *et al.*, 1988; Gabrielli *et al.*, 1991), habiéndose relacionado esta reactividad con el reconocimiento de epítomos galactosil (α 1-3)-galactosa presentes en LMN de sarcoma murino (Gabrielli *et al.*, 1991).

La LMN es una glicoproteína multidominio localizada en la membrana basal, la matriz extracelular sobre la que se apoyan las células epiteliales y que rodea células grasas y musculares entre otras. Esta glicoproteína multidominio está formada por dos cadenas ligeras B1 y B2 de aproximadamente el mismo tamaño (230 y 220 Kd), y una cadena pesada A (400 Kd) que se asocian formando una estructura cruciforme estabilizada por puentes disulfuro (Beck *et al.*, 1990; Timpl *et al.*, 1987). La LMN fue aislada inicialmente a partir de tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) ya que puede ser fácilmente extraída y purificada de esta fuente bajo condiciones no reductoras y no

desnaturalizantes. Debido a que el aislamiento de la LMN de otras fuentes implica tratamientos desnaturalizantes, la mayoría de los estudios inmunológicos se han llevado a cabo con LMN de este origen. Esta LMN posee una identidad del 74% en las regiones G2 a G5 con LMN humana, y una homología del 90% en otras partes de la molécula (Beck *et al.*, 1990).

Se han atribuido a esta glicoproteína multitud de funciones entre las que se incluyen adhesión, migración, crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares (Sasaki *et al.*, 1988; Aumailley *et al.*, 1987; Graft *et al.*, 1987; Kuboata *et al.*, 1992). Así, la LMN interacciona con células a través de un gran número de receptores (integrinas y no integrinas), y con otros componentes de membranas basales como colágeno tipo IV, proteoglicanos, y nidogen/entactina (Mecham, 1991; Clément *et al.*, 1990; Languino *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1990).

3-. Autoanticuerpos e infestaciones por parásitos. Relación con la respuesta de autoanticuerpos característica de pacientes con LES.

La relación entre enfermedades autoinmunes e infecciosas ha sido estudiada durante mucho tiempo. Aunque como ya se comentó anteriormente la mayoría de los estudios se han encaminado a la búsqueda de homologías de secuencia entre autoantígenos y proteínas de origen vírico, actualmente se está analizando la existencia de reactividades similares en infestaciones por parásitos.

Una de las características que relacionan las enfermedades autoinmunes como el LES y las infestaciones por parásitos, es la hipergammaglobulinemia asociada al reconocimiento de una gran variedad de antígenos propios (Gharavi *et al.*, 1988; Shoenfeld & Cohen, 1987). El conocimiento que se tiene actualmente sobre los autoantígenos Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP y fosfoproteínas ribosomales P0, P1 y P2, ha permitido comprobar que éstos participan activamente en procesos vitales para la célula como transcripción y síntesis de proteínas. Así, podría darse la circunstancia de que dentro de la respuesta policlonal desarrollada por un paciente parasitado, se pudiera incluir el reconocimiento de estos autoantígenos altamente conservados e identificados en especies

filogenéticamente alejadas (Tabla IV).

En este sentido, estudios de inmunoprecipitación han permitido comprobar que sueros con actividades anti-*La/SSB*, *Sm*, *UI RNP* o *anti-ribosomal* son capaces de reconocer polipéptidos similares asociados a ARN de tamaños parecidos en el protozoo *Plasmodium falciparum*, el causante de la malaria en humanos, indicando que los autoanticuerpos humanos reconocen epítomos muy conservados presentes incluso en eucariotas inferiores (Francoeur *et al.*, 1985b). Por otro lado, el análisis de la secuencia de uno de los polipéptidos de la partícula *Ro/SSA* (calreticulina) reconocido por el suero de pacientes con LES, ha permitido identificar una gran homología (67%) con un epítomo inmunodominante de *Onchocerca volvulus* (McCauliffe *et al.*, 1990a; McCauliffe *et al.*, 1990b; Unnasch *et al.*, 1988). Se ha postulado que esta elevada homología sea la responsable de la aparición de autoanticuerpos anti-Ro/SSA en pacientes con oncocercosis (Lux *et al.*, 1992). En la enfermedad de Chagas se ha descrito la existencia de anticuerpos anti-ribosomales asociados con cardiomiopatía y concretamente con miocarditis activa, encontrándose además una homología significativa entre uno de los principales determinantes antigénicos de *Trypanosoma cruzi* y las *fosfoproteínas ribosomales P0, P1 y P2* reconocidas por el 12% de sueros de pacientes con LES (Mesri *et al.*, 1990; Levin, 1991).

Otros autoanticuerpos característicos del LES y que se han identificado también en infestaciones por parásitos son los autoanticuerpos anti-*ADN*. Estos anticuerpos se han encontrado en pacientes con esquistosomiasis y filariasis, sin que haya una aparente relación con los síntomas clínicos asociados a su presencia en LES (Thomas *et al.*, 1989). Del mismo modo, se han encontrado niveles elevados de anticuerpos anti-fosfolípido (principalmente aniónicos como la *cardiolipina*) en pacientes con malaria y filariasis entre otros, aunque su asociación con riesgo de padecer trombosis o abortos repetitivos no ha podido ser demostrada (Thomas *et al.*, 1989; Facer & Agiostratidou, 1994).

Estas reactividades cruzadas no se han encontrado dirigidas sólo a antígenos nucleares, citoplásmicos o de membrana. Numerosos estudios han permitido identificar la presencia de anticuerpos dirigidos a componentes de MEC como laminina o colágenos (Tabla IV).

TABLA IV. Anticuerpos antinucleares, anti-citoplasma y anti-matriz extracelular en infestaciones por parásitos.

ANTIGENO	PARASITOSIS	REFERENCIA
Fosfoproteínas ribosomales P0, P1 y P2	Enfermedad de Chagas	Mesri <i>et al.</i> , 1990
Ro/SSA 48 Kd (calreticulina)	Oncocercosis	Lux <i>et al.</i> , 1992
DNA	Filariasis, Esquistosomiasis	Thomas <i>et al.</i> , 1989
Cardiolipina	Filariasis, Esquistosomiasis Malaria	Thomas <i>et al.</i> , 1989 Facer & Agiostratidou, 1994
Laminina	Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis Filariasis	Towbin <i>et al.</i> , 1987 Petralanda & Piessens, 1994
Colágeno tipo IV	Filariasis	Petralanda & Piessens, 1994

Así, se ha comprobado la existencia de anticuerpos anti-LMN en enfermedad de Chagas, leishmaniasis cutánea americana y, recientemente, en filariasis (Towbin *et al.*, 1987; Petralanda & Piessens, 1994). En estos casos, al igual que en los anticuerpos anti-LMN detectados en pacientes con esclerodermia y en población normal, la reactividad está dirigida principalmente a epítomos galactosil (α 1-3)-galactosa presentes en LMN (Towbin *et al.*, 1987; Avila *et al.*, 1988; Gabrielli *et al.*, 1991). En algunos casos se ha podido identificar la existencia de proteínas semejantes a LMN en la superficie de los parásitos, postulándose que su reconocimiento pueda ser el responsable de la producción de estos anticuerpos (Bretana *et al.*, 1986).

Los anticuerpos anti-colágeno se han detectado también en infestaciones por parásitos. Así, el suero de pacientes parasitados por *O. volvulus* contiene anticuerpos reactivos con colágeno tipo IV pero no con tipos I-III. Aunque se han descrito moléculas semejantes a colágenos humanos en la superficie de algunos nemátodos de la Superfamilia Filarioidea (Selkirk *et al.*, 1989), la reactividad

encontrada en el suero de pacientes con oncocercosis no ha podido ser absorbida con proteínas de cutícula, habiéndose relacionado la presencia de éstos anticuerpos con la degradación de colágenos de membrana basal por proteasas derivadas del parásito (Petalanda & Piessens, 1994).

Por tanto, la identificación de proteínas de protozoos y helmintos homólogas a autoantígenos humanos nucleares, citoplásmicos o de MEC, podría ser un indicador tanto de un origen infeccioso en la aparición de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes, como de un posible papel patogénico de los autoanticuerpos en las manifestaciones clínicas asociadas a infestaciones por parásitos (Levin, 1991; Meilof *et al.*, 1993).

OBJETIVOS

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se fundamenta en el estudio comparativo de la respuesta humoral a antígenos nucleares, citoplásmicos y de matriz extracelular en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y en infestaciones por protozoos y/o helmintos, con el objetivo de analizar si en ambas situaciones de hipergammaglobulinemia se pueden originar anticuerpos dirigidos frente a los mismos autoantígenos y, si así fuera, evaluar posibles diferencias en su reconocimiento.

Este estudio se ha centrado en dos aspectos:

1-. En primer lugar, en el análisis de la respuesta a **autoantígenos nucleares y citoplásmicos de naturaleza ribonucleoprotéica (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP y ribosomas)** en pacientes con LES y en una población heterogénea de pacientes parasitados (protozoos y/o helmintos). El objetivo es analizar si la respuesta policlonal desarrollada por individuos de esta última población, puede incluir el reconocimiento de estos autoantígenos muy conservados y característicos de LES.

Esto nos permitirá además desarrollar ensayos de "Western blot" sensibles y fiables que permitan su utilidad para la detección de autoanticuerpos en pacientes con LES.

2-. En segundo lugar, en el análisis comparativo de la respuesta a **laminina (matriz extracelular)** en pacientes parasitados por nemátodos de la Superfamilia Filarioidea, LES y población normal con el objetivo de estudiar posibles diferencias en el reconocimiento de esta glicoproteína.

Los resultados nos permitirán discutir sobre la especificidad de la respuesta de autoanticuerpos anti-RNP en LES, así como sobre la posibilidad de que al desarrollarse una respuesta de anticuerpos dirigidos a un mismo antígeno tanto en LES como en infestaciones por parásitos, el reconocimiento de éste sea o no semejante.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES.

1. Sueros.

1.1. Población de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Cien muestras de suero procedentes del Servicio de Reumatología del Hospital Ramón y Cajal (Madrid), y pertenecientes a pacientes diagnosticados que cumplieran al menos tres de los once criterios de la Asociación Americana de Reumatología (AAR) para el diagnóstico de esta enfermedad.

1.2. Población de pacientes parasitados. Cuarenta y ocho muestras de suero procedentes del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva (CIC, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). La presencia de parásitos se determinó en el Servicio de Microbiología del citado centro. La mayoría de estos sueros pertenecían a pacientes parasitados por nemátodos de la Superfamilia Filarioidea (*Mansonella perstans*, *M. streptocerca*, *Onchocerca volvulus* y *Loa loa*), encontrándose también nemátodos de la Superfamilia Ascaridoidea (*Ascaris lumbricoides*) y Trichuroidea (*Trichuris trichiura*), tremátodos de la Superfamilia Schistosomatoidea (*Schistosoma mansoni*) y varias especies de protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis* y *Plasmodium falciparum*).

- Subpoblación I: muestras de sueros de una población heterogénea de individuos parasitados (n=33). Tres muestras pertenecían a sujetos con eosinofilia e IgE elevada pero no se detectaron parásitos en el momento del estudio. La mayoría de estos sueros fueron analizados por IFI sobre células Hep-2 y criocortes de tejido de rata, empleándose posteriormente para el estudio de la presencia de anticuerpos anti-ribonucleoproteína por ELISA, "Western blot" e inmunoprecipitación de ARN. La identidad de éstos y los resultados del examen parasitológico aparecen en la Tabla V.

- Subpoblación II: muestras de suero seleccionadas en base a la existencia de parásitos de la Superfamilia Filarioidea (n=30) y que fueron empleadas para el análisis de la presencia de anticuerpos anti-laminina. En esta subpoblación se incluyeron aquellos sueros de la población anterior en los que

había suficiente volumen de muestra, ampliando el ámbito de estudio hasta un total de 30 muestras. La identidad de los sueros y los resultados del examen parasitológico aparecen en la Tabla VI.

1.3. Población de controles normales. Treinta muestras de suero de población normal española seleccionada aleatoriamente procedentes del CIC, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

1.4. Sueros controles con autoanticuerpos de especificidad conocida. Muestras proporcionadas por los Servicios de Inmunología de los Hospitales Gregorio Marañón, La Paz, Ramón y Cajal (Madrid) y Santa Cruz y San Pablo (Barcelona). Los autoantígenos reconocidos habían sido determinados previamente por contraelectroforesis, "Western-blot" o inmunoprecipitación de ARN.

Todos los sueros fueron alicuotados y almacenados a -40° C.

TABLA V. Identidad de sueros y parásitos encontrados en la población heterogénea de sujetos parasitados analizada por IFI sobre células Hep-2 y criocortes de tejido de rata, así como por ELISA, "Western blot" e inmunoprecipitación de ARN con antígenos nucleares y citoplásmicos.

IDENTIDAD	EXAMEN PARASITOLÓGICO
P1	<i>B. hominis</i>
P2	<i>M. perstans</i> , <i>L. loa</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>E. histolytica</i>
P3	<i>O. volvulus</i> , <i>M. perstans</i> , <i>M. streptocerca</i>
P4	<i>O. volvulus</i>
P5	<i>M. perstans</i>
P6	<i>M. perstans</i>
P7	<i>M. perstans</i>
P8	<i>M. perstans</i>
P9	<i>O. volvulus</i>
P10	<i>M. perstans</i> , <i>O. volvulus</i>
P11	<i>M. perstans</i>
P12	<i>E. mansonii</i>
P13	<i>A. lumbricoides</i>
P14	<i>M. perstans</i> , <i>L. loa</i> , <i>T. trichiura</i>
P15	<i>T. trichiura</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>E. histolytica</i>
P16	<i>M. perstans</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>G. lamblia</i>
P17	<i>M. perstans</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>B. hominis</i>
P18	N.D.
P19	<i>M. perstans</i>
P20	<i>M. perstans</i> , <i>O. volvulus</i> , <i>A. lumbricoides</i>
P21	<i>M. perstans</i> , <i>B. hominis</i>
P22	<i>M. perstans</i>
P23	N.D.*
P24	N.D.
P25	<i>A. lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>E. histolytica</i> , <i>B. hominis</i> , <i>O. volvulus</i>
P26	<i>M. perstans</i> , <i>T. trichiura</i>
P27	<i>M. perstans</i> , <i>L. loa</i>
P28	<i>M. perstans</i> , <i>B. hominis</i>
P29	<i>O. volvulus</i>
P30	<i>M. perstans</i>
P31	<i>O. volvulus</i>
P32	<i>O. volvulus</i>
P33	<i>M. perstans</i>

N.D.: No se encontraron parásitos en el momento del estudio. N.D*.: paciente infectado por *Treponema pallidum*.

TABLA VI. Identidad de sueros y parásitos encontrados en la población seleccionada para el estudio de la presencia de anticuerpos anti-laminina.

IDENTIDAD	EXAMEN PARASITOLÓGICO
P2	<i>M. perstans</i> , <i>L. loa</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>E. histolytica</i>
P3	<i>O. volvulus</i> , <i>M. perstans</i> , <i>M. streptocerca</i>
P4	<i>O. volvulus</i>
P5	<i>M. perstans</i>
P6	<i>M. perstans</i>
P8	<i>M. perstans</i>
P9	<i>O. volvulus</i>
P10	<i>M. perstans</i> , <i>O. volvulus</i>
P11	<i>M. perstans</i>
P14	<i>M. perstans</i> , <i>L. loa</i> , <i>T. trichiura</i>
P29	<i>O. volvulus</i>
P30	<i>M. perstans</i>
P31	<i>O. volvulus</i>
P32	<i>O. volvulus</i>
P33	<i>M. perstans</i>
P34	<i>L. loa</i> , <i>P. falciparum</i>
P35	<i>M. perstans</i> , <i>L. loa</i> , <i>T. trichiura</i>
P36	<i>L. loa</i>
P37	<i>M. perstans</i>
P38	<i>O. volvulus</i>
P39	<i>O. volvulus</i> , <i>M. perstans</i>
P40	<i>M. perstans</i>
P41	<i>M. perstans</i>
P42	<i>M. perstans</i> , <i>O. volvulus</i>
P43	<i>M. perstans</i>
P44	<i>M. perstans</i>
P45	<i>M. perstans</i> , <i>O. volvulus</i>
P46	<i>M. perstans</i>
P47	<i>M. perstans</i>
P48	<i>L. loa</i>

2. Anticuerpos.

2.1. Anticuerpo monoclonal (clon MK1AG) anti-IgG(Fc) humana conjugado con FA (The Binding Site, Birmingham, UK).

2.2. Anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humana (cadena γ) conjugado con FITC (Dako, Glostrup, Denmark¹ y Silenus, Hawthorn Victoria, Australia²).

2.3 Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (cadena γ) conjugado con FA (Tago, Burlingame, CA, USA).

2.4. Anticuerpo policlonal de cabra anti-Ig de conejo conjugado con FA (Tago, Burlingame, CA,

USA).

2.5. Anticuerpo policlonal de cerdo anti-Ig de conejo conjugado con FITC (Tago, Burlingame, CA, USA).

2.6. Anticuerpos monoclonales anti-IgG1 (clon 8c/6-39), IgG2 (clon HP6014), IgG3 (clon HP6050) e IgG4 (clon HP6023) humana conjugados con FA (The Binding Site, Birmingham, UK).

2.7. Anticuerpo policlonal anti-laminina de sarcoma murino obtenido en conejo (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA).

2.8. Anticuerpo monoclonal GoH3 anti- α 6 (VLA-6) proporcionado por el Dr. Sonnenberg del Departamento de Biología Celular del "Netherlands Cancer Institute", y anticuerpo monoclonal HP1/7 anti- α 4 (VLA-4) proporcionado por el Dr. O. de Landázuri del Servicio de Inmunología del Hospital de la Princesa.

3. Fuentes de antígenos empleadas.

3.1. Portas de 8 y 4 pocillos con criocortes de hígado, riñón y estómago de rata (BioSystem, Barcelona, España).

3.2. Portas de 12 pocillos con células Hep-2 (Mardx, Carlsbad, CA, USA).

3.3. Extracto acetónico en polvo de timo de conejo (Pel-Freez Biologicals Rogers, Ark, USA), a partir del cual se detectó la presencia de autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm y U1 RNP.

3.4. Bazo humano procedente de trasplante cedido por el Hospital 12 de Octubre (Madrid) a partir del cual se obtuvo el antígeno Ro/SSA parcialmente purificado.

3.5. Hígado y cerebro de rata adulta a partir de los cuales se obtuvieron ribosomas purificados.

3.6. Método de ELISA indirecto con autoantígenos Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP recombinantes (Lipogen RheumELISA System, Bio-Whittaker, Inc., Walkersville, USA).

3.7. Laminina de sarcoma murino Engelbreth Holm Swarm (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany).

3.8. ADN de hélice sencilla de timo de ternera (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA).

3.9. Fibronectina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA).

4. Aparataje y materiales.

- Cubeta de electroforesis “Mini-Protean II” (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Fuentes alimentadoras (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA; Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Sistema de transferencia en semi-seco “Trans Blot SD” (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Aparato multi-ensayo “Mini-Protean II” (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Equipo de patrones biotinizados de bajo peso molecular, y preteñidos de alto y bajo peso molecular (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Conjugado avidina-fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Método de revelado de fosfatasa alcalina en “Western blot” (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Placas de microtitulación (Polysorp, Nunc, Denmark).
- Método de revelado de fosfatasa alcalina en ELISA (Sigma Chemical Co. St Louis MO, USA).
- Ultracentrífuga Beckman L-80 (Beckman, Inc., CA, USA).
- Centrífuga Omnifuge 2.0 RS y Biofuge 17RS (Heraeus Sepatech GmbH, Germany).
- Membrana de diálisis. Corte P.M: 3.500 (Spectrum Medical Industries, CA, USA).
- Homogeneizador de cristal teflón (Pobel) y de aspás (Polytron, Luzern, Switzerland).
- Bomba peristáltica y colector de fracciones Spectra/Chrom (Spectrum).
- Resina de intercambio iónico. Soporte de intercambio aniónico Macro-Prep 50 Q (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Equipos de cuantificación de proteínas por Coomassie y ácido bicínico (Pierce, Rockford, IL, USA).

- Analizador de niveles de IgG por nefelometría (Beckman Instruments, Galway, Ireland)
- Espectrofotómetro U-2000 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan).
- Agitador magnético SM1 (Stuart scientific, UK).
- Liofilizador Virtis (Sentra, Inc., NY, USA).
- Columna de proteína G sefarosa (Pierce, Rockford, USA).
- Columna de excelulosa GF-5 (Pierce, Rockford, USA).
- Frascos de cultivo de 25 y 75 cm² (Costar, Cambridge, MA, USA).
- Pipetas de 5 y 10 ml y tubos cónicos de 50 ml estériles (Becton Dickinson, New Jersey, USA).
- Microscopio de fluorescencia Diaplan (Wild Leitz, GmbH, Germany).
- Microscopio invertido Diaphot-TMD (Nikon, Tokyo, Japan)
- Lector de placas de microtitulación 340 ATC (SLT Instruments).
- Películas para fotografía de fluorescencia Fujicolor HG400.
- Películas para diapositivas de fluorescencia (ELITE, Ektachrome 400).

5. Reactivos.

- Acrilamida, N,N'-metilen bisacrilamida, persulfato amónico, dodecil sulfato sódico (SDS), β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, azul Coomassie R-250, glicina, Tris-(hidroximetil) aminometano, N,N,N',N' tetrametiletilendiamina (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).

- Glicerina, cloruro sódico, etanol, ácido clorhídrico, fosfato mono y dipotásico, ácido acético, metanol, acetona (Panreac, Barcelona, España).

- Albúmina de suero bovino, carbonato y bicarbonato sódico, cloruro amónico, acetato magnésico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), Tween-20, negro amido, ditiotreitól (DTT) (Serva, Heidelberg, Germany).

- Fluoruro de metil fenil sulfonilo (PMSF), Nonidet P-40, meta-periodato sódico, forbol miristato acetato (PMA), violeta cristal, gelatina tipo A, fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1),

(Sigma, Chemical Co, St Louis MO, USA).

- Sulfato de gentamicina, suero fetal bovino (Lote 03015), L-glutamina, penicilina-estreptomicina, RPMI-1640 (Bio-Whittaker, Maryland, USA).

II. METODOS.

1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Esta técnica se realizó sobre portas con criocortes de hígado, riñón y estómago de rata y sobre la línea celular Hep-2. El protocolo fue en ambos casos igual excepto que las incubaciones sobre células Hep-2 se realizaron a 37° C.

Para la realización de este ensayo se incubaron sueros diluidos 1/40 en PBS (0,1 M tampón fosfato, 0,15 M ClNa, pH 7,2), IgG purificada (40 ó 80 µg), o un antisuero policlonal anti-LMN (1/50) durante 30 min. en los portas. Los anticuerpos unidos se detectaron con un antisuero de conejo anti-IgG humana conjugado con FITC (1/20¹ ó 1/40² en PBS; ver anticuerpos empleados en pág. 22 de Materiales), o un antisuero policlonal de cerdo anti-Ig de conejo (1/30 en PBS). Después de cada incubación, los portas se lavaron tres veces durante 5 min. con PBS. Después del lavado final se añadió una solución de glicerol al 70% en PBS, colocando un cubre y guardando la preparación un mínimo de 2 h. a 4° C antes de visualizar por el microscopio de fluorescencia.

2. Preparación del extracto de timo de conejo para la detección de autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm y U1 RNP.

El extracto se preparó básicamente como está descrito (Kurata & Tan, 1976). El extracto acetónico liofilizado se disolvió en PBS, 1 mM PMSF a una concentración de 100 mg/ml manteniéndolo a 4° C y en agitación durante toda la noche por medio de un agitador magnético a bajas revoluciones. Posteriormente se centrifugó a 1.800 g durante 40 min., se calculó la concentración de proteínas del sobrenadante, y se guardaron alícuotas de 400 µg a -40° C. Estas alícuotas sirvieron para cargar toda la longitud de un gel de poliacrilamida-SDS.

3. Preparación del extracto de bazo humano para la detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA.

El antígeno Ro/SSA parcialmente purificado se obtuvo a partir de bazo humano empleando el método descrito previamente (Clark *et al.*, 1969) con algunas modificaciones. Un bazo humano procedente de transpalante se troceó y se homogeneizó en dos volúmenes de PBS, 0,1 mM PMSF. Después de una centrifugación a 33.000 g durante 30 min., el sobrenadante se guardó a 4° C durante toda la noche y se centrifugó posteriormente a 15.000 g durante 10 min. Este sobrenadante se aplicó a una columna de intercambio aniónico (0,8 cm x 8,2 cm) previamente equilibrada con PBS, 0,1 mM PMSF. Una vez que la muestra pasó por la columna, se lavó con PBS cuatro veces el volumen de la columna hasta eliminar toda la hemoglobina. Para la elución de Ro/SSA se aplicó 0,1 M tampón fosfato, 0,5 M ClNa recogiendo fracciones de 2 ml a las que se fue midiendo la absorción a 280 nm. Posteriormente se mezclaron las fracciones con mayor lectura a esta longitud de onda y se ensayó por transferencia a papel de nitrocelulosa y revelado con sueros control con actividad anti-Ro/SSA. Una vez confirmada la existencia de antígeno Ro/SSA, se dializó toda la noche a 4° C frente a PBS y se guardaron alícuotas de 250 µg suficientes para cargar toda la longitud de un gel de poliacrilamida-SDS.

4. Obtención de ribosomas purificados de hígado y cerebro de rata adulta para la detección de autoanticuerpos anti-ribosomales (fosfoproteínas P0, P1 y P2).

Un hígado o cerebro de rata se homogeneizó con un homogeneizador de cristal-teflón en tres veces su peso en volumen de tampón TA (20 mM Tris, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0,1 mM EDTA, CINH_4 100 mM, acetato de magnesio 5 mM, pH 7.6), centrifugándose posteriormente a 27.000 g durante 30 min. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 100.000 g dos horas y media, resuspendiendo el precipitado en TAS (TA sin acetato de magnesio). Posteriormente se separaron las

proteínas asociadas a ribosomas lavándolos durante 90 min. con 0,5M ClK en agitación continua, centrifugando posteriormente a 100.000 g otras dos horas y media. El precipitado resuspendido en TASN (tampón TA sin acetato de magnesio ni ClNH_4) contiene ribosomas intactos libres de proteínas asociadas (Calés *et al.*, 1985). Todos los pasos se realizaron a 4° C.

5. Análisis de la pureza de la preparación de laminina (LMN) de sarcoma murino.

La pureza de esta preparación se determinó por tinción con Coomassie de un gel de poliacrilamida-SDS al 6% en condiciones reductoras y desnaturizantes.

6. Detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP por “Western blot”.

Alícuotas de 250 µg de extracto de bazo humano ó 400 µg de timo de conejo diluidas 1/3 en tampón de electroforesis y hervidas y centrifugadas 5 min., se aplicaron en toda la longitud de un pocillo de 73 mm formado en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%, realizando la electroforesis como está descrito (Laemmli, 1970). En el pocillo de referencia se aplicaron patrones biotinizados diluidos 1:20 en preteñidos, con el fin de observar la electroforesis, la posterior transferencia a nitrocelulosa, y de estimar el peso molecular de los polipéptidos reconocidos por los sueros.

Una vez terminada la electroforesis, se lavó el gel y se equilibró la membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia durante 3 min. La transferencia a nitrocelulosa se realizó en semi-seco durante 1 h a 5,5 mA/cm² de gel en tampón carbonato-bicarbonato (3 mM carbonato sódico, 20 mM bicarbonato sódico, pH 9,9) (Dunn, 1986), pero se añadió 20% etanol en lugar de metanol (Van Dam *et al.*, 1990). La membrana se bloqueó 1 h. con TBS (0,1 M Tris, 0,9% ClNa, pH 7,2)-3% BSA-0,1% Tw, incubándola posteriormente durante toda la noche a temperatura ambiente con sueros normales (1/50), de pacientes parasitados (1/50), o de pacientes con LES (1/100) diluidos en la

misma solución. Después de tres lavados de 5 min. con TBS-3% BSA-0,1% Tw, se incubó la membrana con un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con FA (1/8.000), y el conjugado avidina-fosfatasa alcalina (1/3.000) en la calle de los patrones biotinilados. Se volvió a lavar la membrana tres veces con TBS-3% BSA-0,1% Tw y una con solución salina, y se reveló con NBT y BCIP siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. El desarrollo de color se paró lavando la membrana con agua destilada cuando comenzó a aparecer fondo.

7. Detección de autoanticuerpos anti-ribosomales por “Western blot”.

Para la detección de estos autoanticuerpos el porcentaje del gel separador fue del 15%, aplicando 500 µg de preparación de ribosomas purificados por gel. El protocolo fue esencialmente el mismo que para la detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP, excepto que la transferencia se realizó en semi-seco con tampón carbonato-bicarbonato-20% metanol (Dunn, 1986) omitiendo el Tw en el tampón de dilución de sueros y antisuero.

8. Detección de anticuerpos anti-LMN por “Western blot”.

Para la detección de estos anticuerpos el porcentaje del gel separador fue del 6%, aplicando 100 µg de LMN por gel. El protocolo fue esencialmente el mismo que para los otros autoantígenos excepto que la muestra no fue hervida sino calentada a 37° C durante 5 min., y la transferencia en semi-seco se realizó durante 45 min. a 5,5 mA/cm² de gel en 25 mM Tris-192 mM glicina-20% metanol, pH 8,3 (Towbin *et al.*, 1979). La membrana se bloqueó con TBS-3% BSA, mientras que los sueros (1/50), el antisuero policlonal anti-LMN (1/16.000) y los antisueros anti-IgG humana (1/8.000) o anti-Ig de conejo (1/20.000) conjugados con FA se diluyeron en TBS-1% BSA.

9. Análisis de la actividad anti-LMN por “Dot-blot”.

Para este ensayo se aplicaron 4 μ l de LMN (200, 100, 50 y 25 μ g/ml en TBS) sometida a diferentes condiciones (nativa y tratada a 100° C durante 4 min., 1% SDS/10% β -mercaptoetanol ó 1% SDS) sobre nitrocelulosa, dejando posteriormente secarse la membrana al aire. En los pasos de bloqueo e incubación con sueros y antisuero el protocolo fué igual que en el “Western blot”.

10. Renaturalización de LMN y fosfoproteínas ribosomales.

La renaturalización de proteínas ribosomales y LMN se llevó a cabo sometiendo el gel de poliacrilamida durante 1 h. a 50 mM Tris-20% de glicerol, pH 7,4 según el protocolo descrito (Van Dam *et al.*, 1990), o incubando la membrana de nitrocelulosa con una solución de NP-40 al 3% en PBS antes de bloquearla (Petit *et al.*, 1989).

11. Inmunoprecipitación de extractos marcados de células HeLa (³²P).

Esta técnica se realizó en el Hospital de Santa Cruz y San Pablo (Barcelona) según el protocolo previamente descrito (Lerner & Steitz, 1979).

12. Detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP por ELISA indirecto con autoantígenos recombinantes.

La detección de autoanticuerpos frente a estos antígenos se realizó a la dilución 1/100 y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En todos los ensayos, se incluyeron controles positivos y negativos necesarios para la validación del ensayo. Para la interpretación de los resultados se incorporó al lector de placas de microtitulación un programa para determinar la positividad o

negatividad de los sueros en función del valor del control negativo y del corte de positividad recomendado por el fabricante. Este corte se estableció según la fórmula: (DO del control negativo/ DO del calibrador incluido en el equipo) + factor de corrección incluido en el equipo = corte de positividad del ensayo.

13. Detección de anticuerpos anti-LMN por ELISA indirecto.

Para este ensayo, se aplicaron 100 µl de LMN (5 µg/ml) diluida en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6 en pocillos de microtitulación y se incubó durante 2 h. a 37° C. Después de lavar la placa con 5 mM Tris pH 7,4, se bloquearon los sitios no específicos con TBS-3% BSA durante 1 h. a temperatura ambiente lavando posteriormente con 5 mM Tris-0,05% Tw, pH 7,4 (T-Tw). Seguidamente se aplicaron los sueros por duplicado diluidos 1/50 en TBS-1%BSA-0,05% Tw dejando la placa en incubación toda la noche a 4° C. Después de lavar con T-Tw, se añadió un antisuero policlonal de cabra anti-IgG humana (1/4.000), o anticuerpos monoclonales anti-IgG1 (1/250), IgG2 (1/500), IgG3 (1/2.000) e IgG4 (1/250) conjugados con FA y diluidos en el mismo tampón que los sueros, dejándolo incubar durante 1 h. a 37° C. Las placas se lavaron de nuevo y se desarrollaron añadiendo pNFF en tampón dietanolamina.

14. Detección de anticuerpos anti-ADN de hélice sencilla por ELISA indirecto.

La preparación de ADN de timo de ternera se sometió en primer lugar a un proceso de repurificación con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico según el protocolo previamente descrito (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la determinación de la presencia de anticuerpos anti-ADN, la mitad de una placa de microtitulación preincubada previamente durante 1 h. a temperatura ambiente con una solución de poli-L-lisina (25 µg/ml en 40 mM Tris, 5 mM EDTA pH 7,5) se incubó durante otra hora a 37° C con

ADN (5 $\mu\text{g/ml}$ en 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8), mientras que a la otra mitad se añadió sólo tampón. Posteriormente se bloqueó la placa con TBS-1% gelatina, y se añadieron los sueros diluidos 1/50 en TBS-0,05% Tw-0,5% gelatina dejándolos en incubación durante toda la noche a 4° C. Después de lavar con T-Tw, se añadió un antisuero policlonal anti-IgG humana conjugado con FA diluido en TBS-0,05% Tw (1/4.000) dejándolo incubar durante 1 h. a 37° C. Las placas se lavaron de nuevo y se desarrollaron añadiendo pNFF en tampón dictanolamina. Los valores de DO de la parte de la placa preincubada exclusivamente con poli L-lisina, se sustrajeron de los obtenidos en el lado de la placa con ADN, con el fin de descartar uniones no específicas (Le Page *et al.*, 1990).

La comparación entre los niveles de estos anticuerpos y los anticuerpos anti-LMN se realizó expresando los resultados como porcentaje de un suero control positivo (anti-ADN o anti-LMN) incluido en cada placa de microtitulación.

15. Purificación de IgG por columna de proteína G-sefarosa.

Se purificó la fracción IgG de una mezcla de sueros de pacientes con LES o filariasis positivos para anticuerpos anti-LMN por ELISA indirecto, así como de sueros individuales que presentaron títulos altos en ELISA. Asimismo se purificó IgG de una mezcla de sueros normales anti-LMN negativos y de un suero normal positivo por este ensayo. Para la obtención de esta fracción, las muestras se diluyeron en tampón de unión y se pasaron por una columna de proteína G-sefarosa equilibrada en el mismo tampón siguiendo el protocolo de la casa comercial. La IgG cluída y neutralizada con tampón fosfato 0,15 M se pasó por una columna de excelulosa GF-5 equilibrada en PBS para eliminar el exceso de sal. Posteriormente se calculó la concentración de proteína de la fracción de IgG purificada por un ensayo de ácido bicincónico.

16. Oxidación de carbohidratos de LMN.

La ruptura química de carbohidratos de LMN se llevó a cabo por oxidación con meta-periodato sódico (Maizels *et al.* 1991). El protocolo seguido fue el mismo que para el ELISA indirecto, pero los pocillos preincubados con LMN se trataron con diferentes concentraciones de meta-periodato sódico durante 30 min. a 4° C en ausencia de luz antes de bloquear y añadir IgG purificada de una mezcla de sueros de pacientes con LES o filariasis ajustadas a la misma actividad anti-LMN (DO 405 nm). Los resultados se expresaron como porcentaje de disminución de lectura de DO a 405 nm: $(1 - (\text{DO pocillos con LMN tratada} / \text{DO pocillos con LMN sin tratar})) \times 100$.

Los valores de lectura de DO de la parte de la placa incubada exclusivamente con solución de periodato o tampón, se restaron de los obtenidos del lado de la placa con LMN tratada o sin tratar con el fin de descartar uniones no específicas.

17. ELISA competitivo con LMN, LMN desnaturalizada por calor, y FN.

Se incubaron fracciones de IgG purificada ajustadas a la misma actividad anti-LMN (DO 405 nm) con concentraciones variables de LMN, LMN desnaturalizada (4 min. durante 100° C) y FN durante toda la noche a 4° C. Esta mezcla se hizo reaccionar con LMN por ELISA según el protocolo descrito anteriormente, expresándose los resultados como porcentaje de inhibición (Ratkay *et al.*, 1991). En el ensayo con FN, la mezcla se centrifugó a 5.000 g durante 10 min. antes de añadirla a los pocillos de microtitulación preincubados con LMN.

18. Ensayo de inhibición de adhesión de células U937 a LMN.

La línea celular mielomonocítica U937 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD) y se cultivó como se ha descrito previamente (Arroyo *et al.*, 1992).

Antes del ensayo de inhibición de adhesión, las células se preincubaron durante 20 min. a 4° C con 50 µg/ml de γ -globulina humana, y durante 30 min. a 37° C con 50 ng/ml de PMA.

El ensayo de adhesión se realizó básicamente como se ha descrito (Arroyo *et al.*, 1992; Dejana *et al.*, 1987). Placas de microtitulación de 96 pocillos se incubaron durante 2 h. a 37° C con 50 µl de LMN (10 µg/ml en PBS) lavándolas posteriormente con PBS, y bloqueando los sitios libres durante 1 hora a 37° C con PBS-1% BSA. Después de lavar de nuevo, se añadió por triplicado 100 ó 50 µl de sueros de pacientes con filariasis positivos para anticuerpos anti-LMN, sueros controles negativos por ELISA, anticuerpo policlonal anti-LMN (1/100 y 1/20.000) o PBS-1% BSA dejándolo incubar durante toda la noche a 4° C. Se lavó la placa dos veces con RPMI añadiendo posteriormente 100.000 células por pocillo resuspendidas en medio incompleto, manteniéndolas en incubación durante 30 min. a 37° C. Para analizar la adhesión mediada por VLA-6 se empleó el anticuerpo monoclonal GoH3 (anti- α 6) y como control negativo HP1/7 (anti- α 4). Para cuantificar la adhesión en presencia o ausencia de sueros se lavó la placa, se fijaron las células añadiendo una mezcla 1/1 de metanol/acetona, se tiñó con cristal violeta al 0,5%, y se midió la DO a 540 nm. La adhesión basal a BSA se restó de los valores obtenidos, expresándose el resultado final como porcentaje de inhibición de la adhesión: $(1 - (\text{adhesión en presencia de suero o anticuerpo policlonal anti-LMN} / \text{adhesión en pocillos libres de actividad anti-LMN})) \times 100$.

19. Metodología estadística.

-El grado de correlación entre los resultados de las técnicas de ELISA con autoantígenos recombinantes y “Western blot” con preparados de timo de conejo y bazo humano en pacientes con LES y población normal, se determinó por medio del estadístico k . Estos valores se interpretaron siguiendo las recomendaciones descritas previamente (Landis & Koch, 1977): $k=0-0,20$ concordancia leve; $k=0,21-0,40$ considerable; $k=0,41-0,60$ moderada; $k=0,61-0,80$ sustancial y $kappa=0,81-1,00$ casi perfecta. El estadístico de McNemar se usó para determinar la presencia o ausencia de sesgo,

considerándose valores mayores de 3,8 como inaceptables para determinaciones biológicas.

- Los niveles de anticuerpos anti-LMN de clase IgG y subclases de IgG en los distintos grupos se compararon utilizando la *t* de student de dos colas y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

- La capacidad de inhibición de adhesión a células U937 en sueros anti-LMN positivos y negativos se comparó empleando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

- La comparación entre diferentes curvas de unión se llevó a cabo utilizando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

- El estudio de correlaciones entre niveles de anticuerpos anti-ADN de hélice sencilla vs niveles de anticuerpos anti-LMN, niveles de IgG vs valores de DO en ELISA con autoantígenos RNP, y niveles de IgG vs porcentaje de inhibición de adhesión de células U937 a LMN se llevó a cabo por medio de una regresión lineal.

RESULTADOS

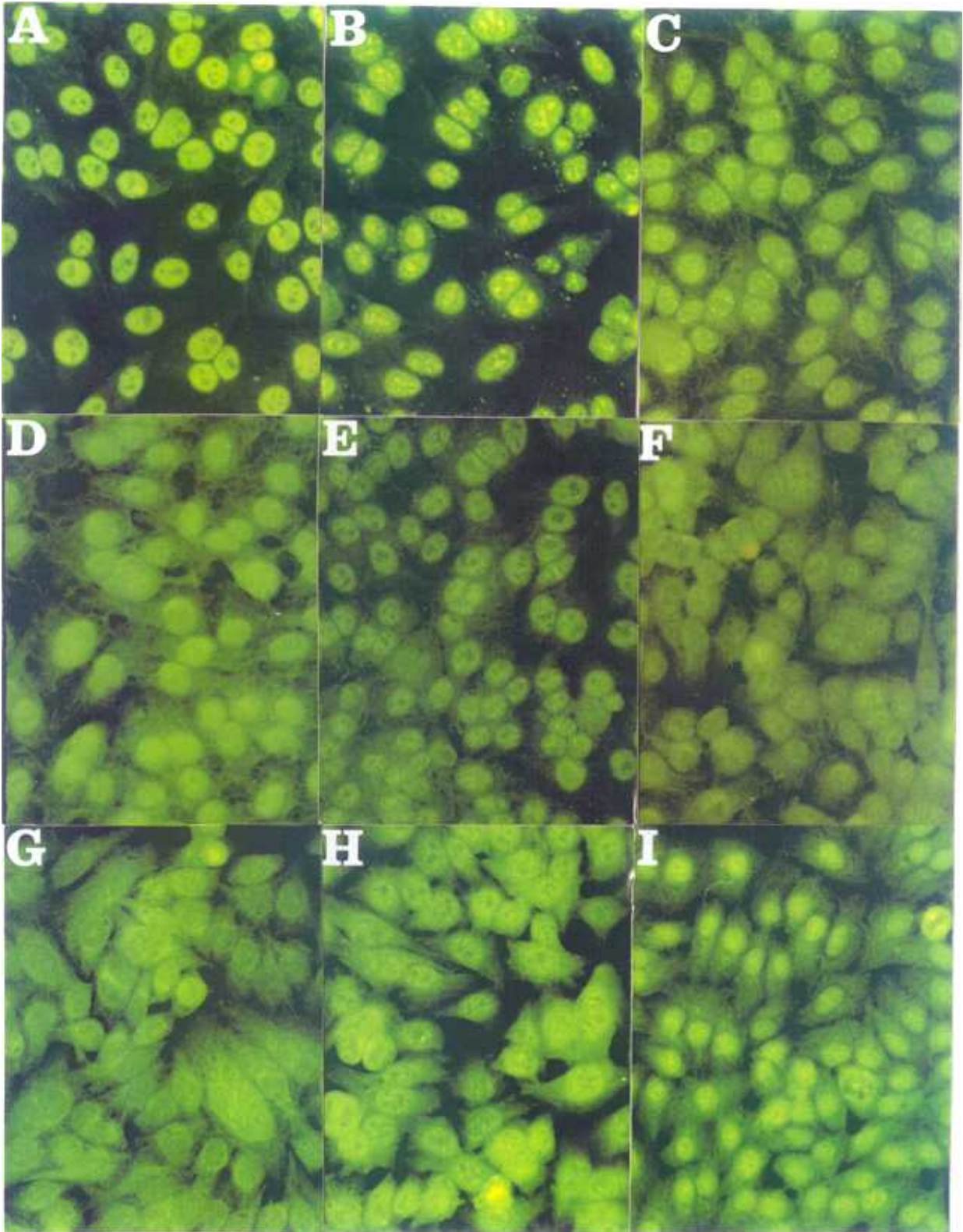
I-. Análisis de la presencia de anticuerpos antinucleares, anti-citoplasma y anti-matriz extracelular en el suero de pacientes parasitados por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Para este estudio se utilizó una población de 33 sueros de pacientes parasitados por protozoos y/o helmintos (Tabla V). La existencia de anticuerpos dirigidos a antígenos nucleares y/o citoplásmicos se analizó sobre células Hep-2, mientras que la presencia de anticuerpos dirigidos a componentes de matriz extracelular (MEC) fue estudiada empleando criocortes de hígado, riñón y estómago de rata.

Sobre el primer sustrato mencionado se analizaron un total de 28 sueros, encontrándose que la mayoría de ellos (26/28) reconocían antígenos de localización nuclear y/o citoplásmica. En algunos sueros, los patrones encontrados fueron similares a los obtenidos con controles de especificidades anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP o ribosomales (Fig. 1; véanse comparativamente los patrones nucleares y/o citoplásmicos de los paneles F-H, B-N, C-L o D-G). Aunque en la mayoría de ellos no pudo atribuirse la imagen de IFI al reconocimiento de estos autoantígenos (Fig. 1; paneles I, J, K, M), no se pudo excluir un fenómeno de solapamiento de patrones similar al observado en los sueros controles de especificidad conocida, donde la presencia de varios autoanticuerpos enmascara el patrón obtenido con controles monoespecíficos (Fig. 1; paneles A-F).

Por otro lado, se analizaron un total de 26 sueros sobre criocortes de tejido de rata, encontrándose presencia de anticuerpos dirigidos a antígenos de MEC en la mayoría de ellos (21/26). En la Fig. 2 se muestran los patrones de fluorescencia más llamativos encontrados sobre este sustrato (paneles A, C y E). El patrón identificado con algunos sueros fue similar al obtenido con un antisuero policlonal anti-LMN (Paneles A-B y C-D). Siete de los sueros que presentaron este patrón de IFI correspondieron a pacientes parasitados por nemátodos de la Superfamilia Filarioidea. En este sustrato, la positividad a antígenos nucleares y/o citoplásmicos identificada en células Hep-2 sólo fue detectada en algunos de los sueros analizados (Fig. 2). En una población de controles normales analizada en

ambos sustratos (n=14), ninguno reconoció estructuras nucleares, citoplásmicas o de matriz extracelular a la dilución 1/40.



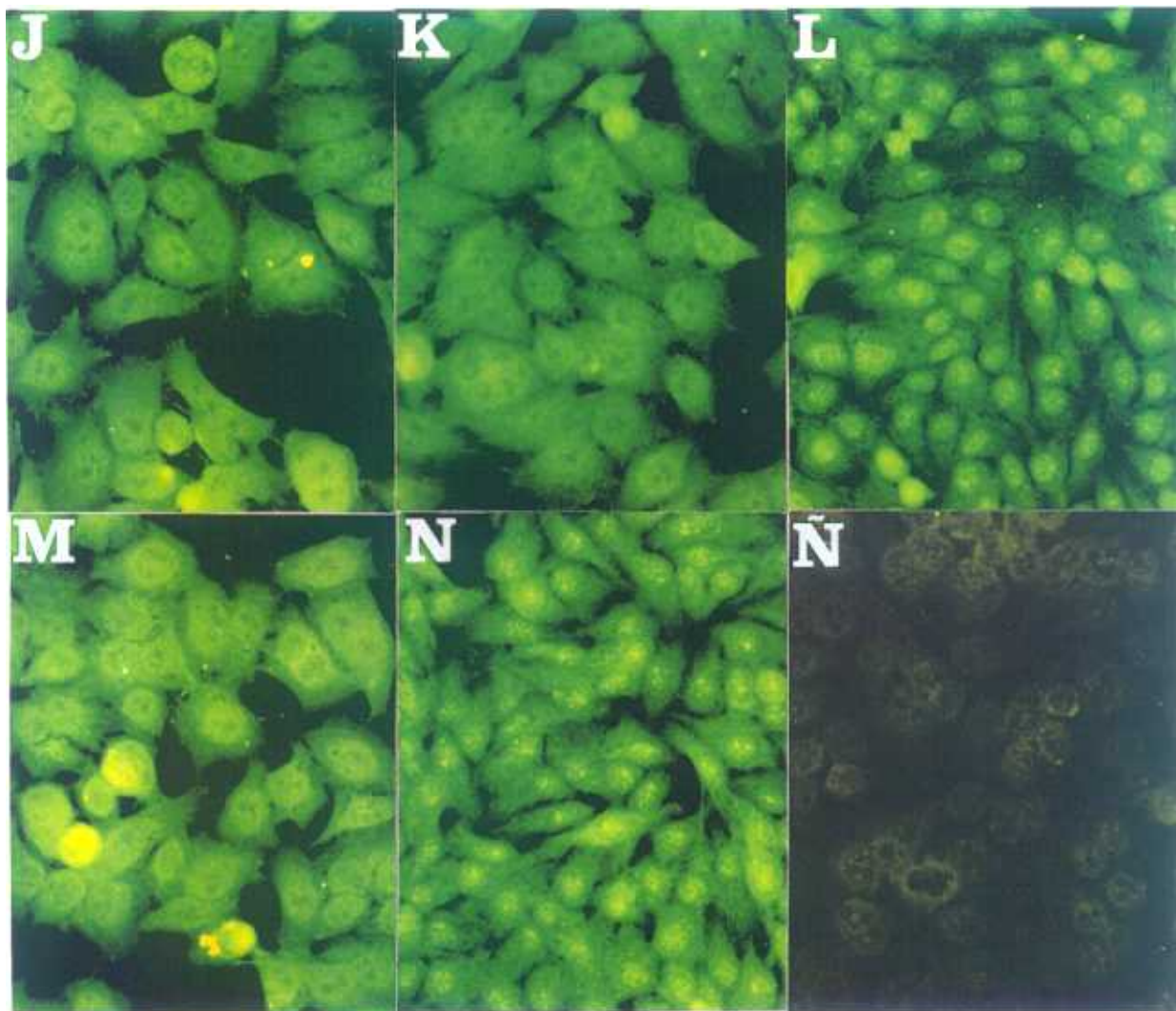
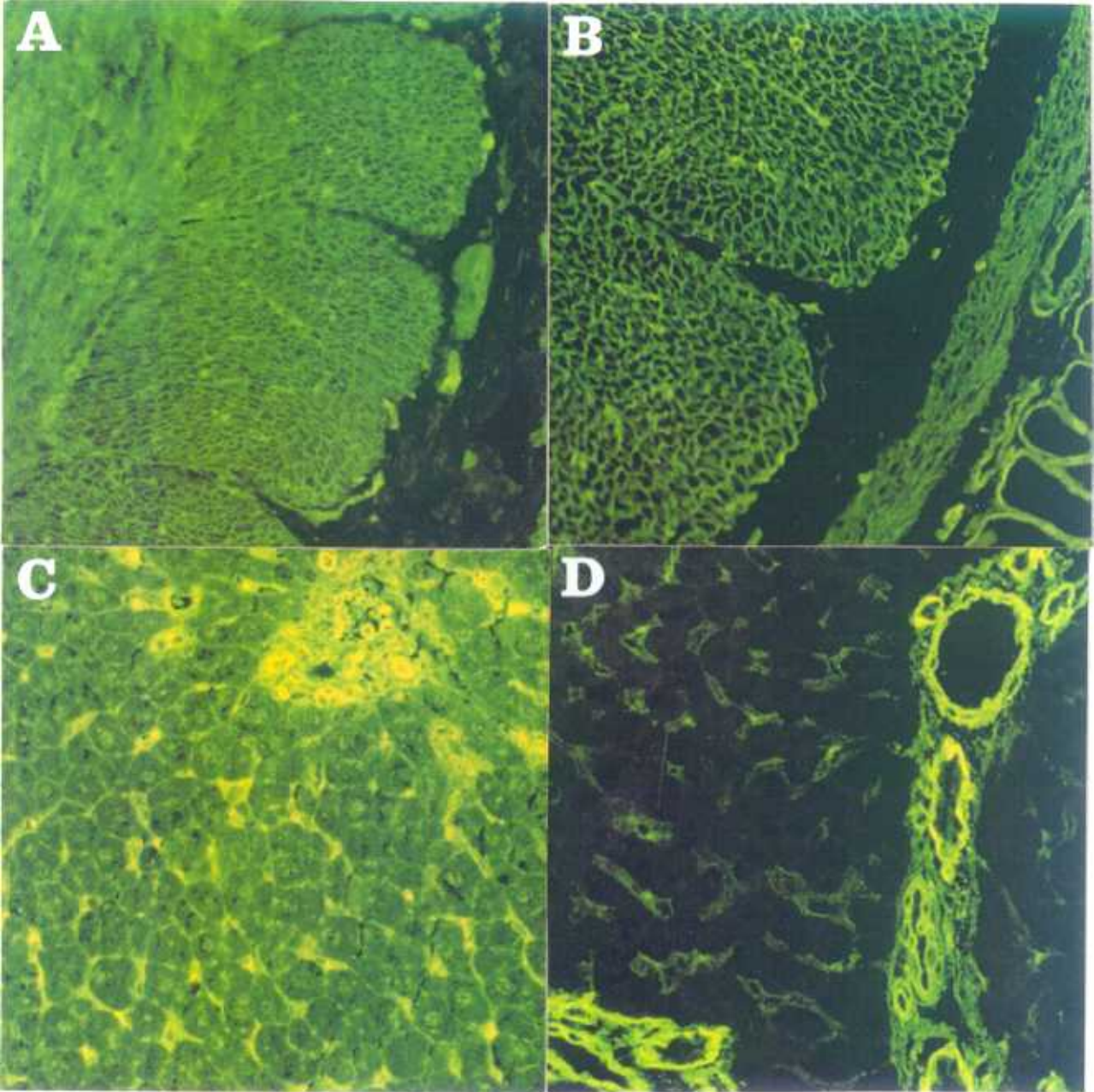


FIGURA 1. Patrones de IFI obtenidos sobre células Hep-2 con sueros controles con autoanticuerpos de especificidad conocida (Paneles A-F) y pacientes parasitados (Paneles G-N). **Panel A:** suero control anti-RNP; **panel B:** suero control anti-Sm y RNP; **panel C:** suero control anti-Sm, RNP y ribosomales; **panel D:** suero control anti-Ro/SSA y La/SSB; **panel E:** suero control anti-Ro/SSA y Sm; **panel F:** suero control anti-Ro/SSA. Los paneles G-N corresponden a sueros de pacientes parasitados: **panel G:** suero P28; **panel H:** P29; **panel I:** P30; **panel J:** P31; **panel K:** P32; **panel L:** P33; **panel M:** suero P17; **panel N:** suero P4. El panel Ñ corresponde a un suero de población normal.



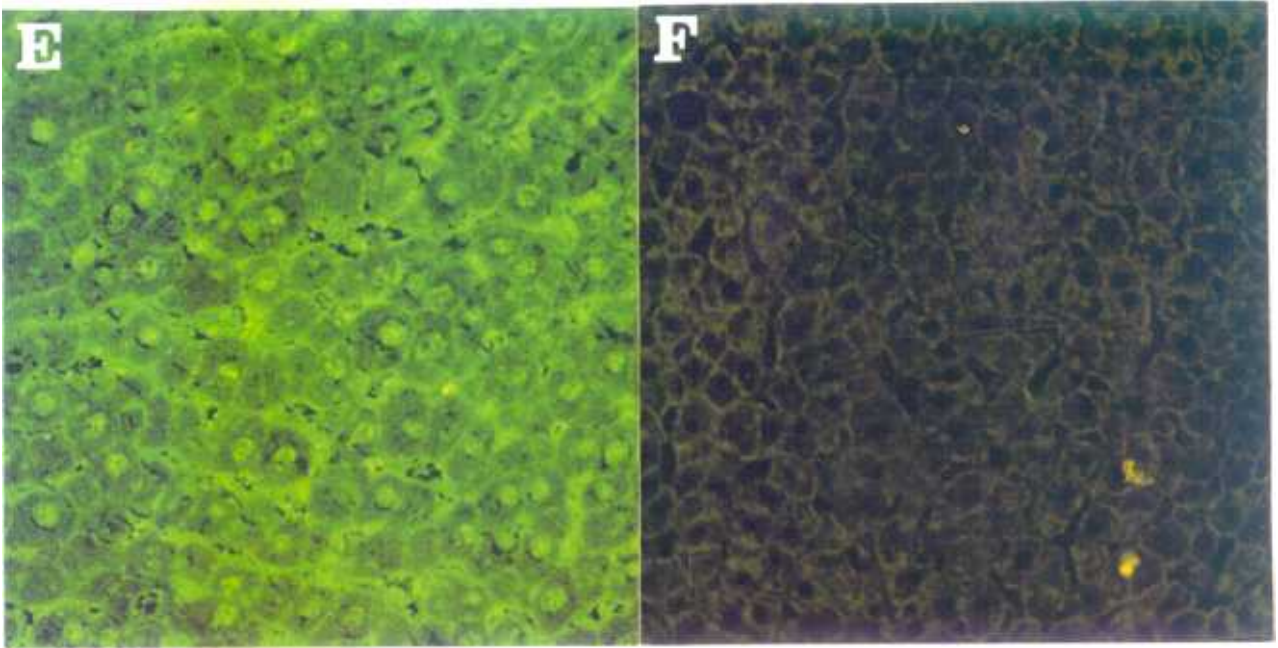


FIGURA 2. Anticuerpos dirigidos a componentes de MEC en musculatura lisa de estómago (paneles A y B) e hígado de rata (paneles C, D y E). Los paneles A, C y E corresponden a sueros de pacientes parasitados (P27, P3 y P4 respectivamente). Los paneles B y D corresponden a un antisuero policlonal anti-LMN, mientras que el panel F es un suero de población normal en hígado de rata. El patrón de IFI mostrado en el panel A fue identificado también en los sueros P3, P4, P10, P20, P23, P25 y P28.

II-. Estudio comparativo de la respuesta de autoanticuerpos anti-ribonucleoproteína (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP, P0, P1 y P2) en pacientes parasitados, LES y población normal.

1-. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP en pacientes parasitados por ELISA con autoantígenos recombinantes.

Se determinó por ELISA la presencia de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP en 30 sueros de la población heterogénea de pacientes parasitados y en 30 sueros de población normal (Tabla V). En todos los ensayos los controles positivos excedieron del mínimo requerido para la validación de la prueba ($RNP > 1,5$; $Sm > 1,4$; $Ro/SSA > 1,1$; $La/SSB > 1,2$), mientras que los controles negativos proporcionados en el método de ELISA no excedieron de 0,2 unidades de DO. Los resultados para cada uno de los autoantígenos se muestran en la Fig. 3 (a y b).

Figura 3a

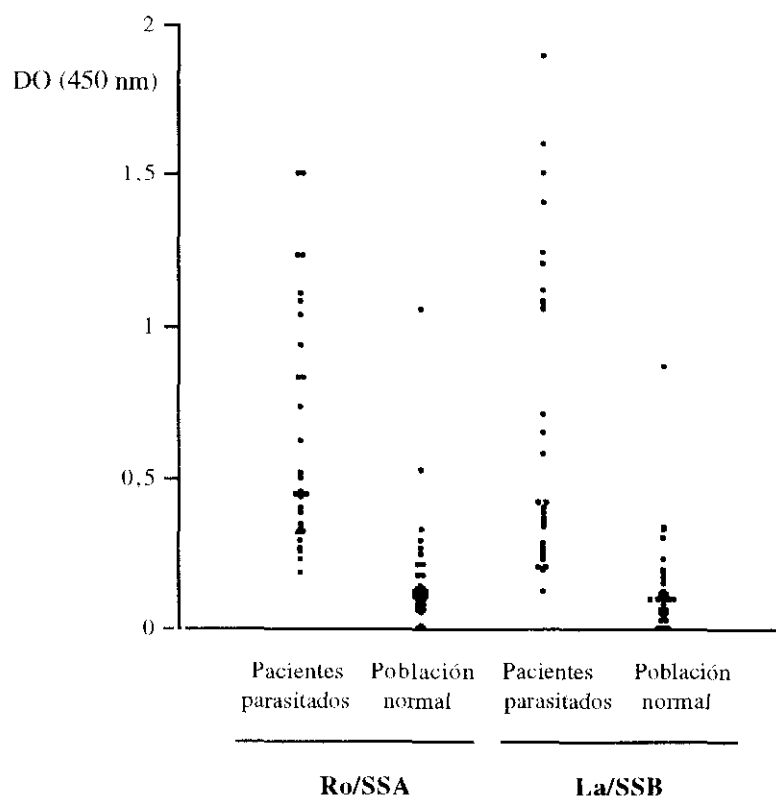


Figura 3b

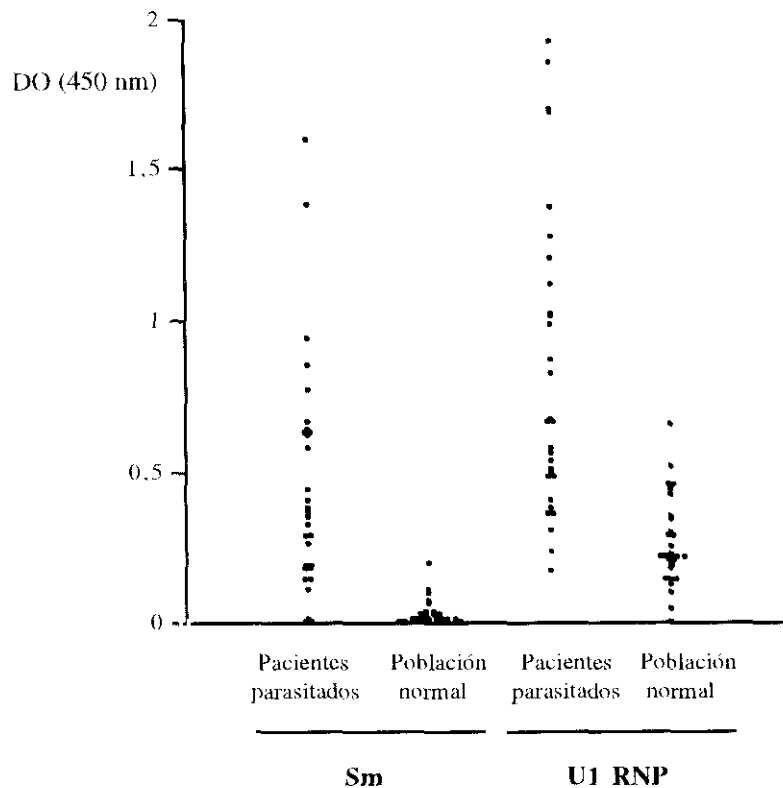


FIGURA 3. Anticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP en suero de pacientes parasitados y población normal por ELISA con autoantígenos recombinantes.

Los valores medios de DO en la población de pacientes parasitados fueron de $0,644 \pm 0,071$ para Ro/SSA, $0,675 \pm 0,092$ para La/SSB, $0,453 \pm 0,069$ para Sm, y $0,824 \pm 0,091$ para U1 RNP. En población normal estos valores fueron de $0,18 \pm 0,036$ (Ro/SSA), $0,146 \pm 0,03$ (La/SSB), $0,034 \pm 0,08$ (Sm) y $0,261 \pm 0,026$ (U1 RNP). Así, los niveles de estos anticuerpos se encontraron significativamente elevados en el grupo de pacientes parasitados en cada uno de los autoantígenos analizados ($p < 0,0001$). Los niveles de IgG medios determinados en 14 sueros de pacientes parasitados fueron de 2267 ± 210 mg/dl, siendo el coeficiente de correlación r entre éstos y la lectura de DO de 0,59 para Ro/SSA, 0,342 para La/SSB, 0,367 para Sm y 0,403 para U1 RNP. Estableciendo el corte de positividad siguiendo las instrucciones del método de ELISA, el 60% de pacientes parasitados presentaron anticuerpos anti-Ro/SSA, 57% anti-La/SSB, 57% anti-Sm, y 67%

anti-U1 RNP, mientras que en población normal, el 93% fue negativo para anti-Ro/SSA, 97% para anti-La/SSB y anti-U1 RNP, y 100% para anti-Sm.

2.- Caracterización por "Western blot" de la respuesta de autoanticuerpos anti-RNP en pacientes con LES.

2.A- Autoanticuerpos anti-ribosomales.

Se analizaron 92 sueros de pacientes con LES encontrándose un 13% de sueros positivos. Todos los sueros positivos reconocieron el polipéptido P0 (38 Kd) y P1 (19 Kd) encontrándose menor positividad para el polipéptido P2 (17 Kd) (Fig. 4). La reactividad frente a P2 se restituyó renaturalizando el gel con Tris-20% glicerol antes de su transferencia a membrana de nitrocelulosa (Fig. 5). No se observó ninguna diferencia al emplear ribosomas purificados de hígado o cerebro, pudiendo utilizarse indistintamente una u otra preparación. En población normal, ningún suero reconoció estos polipéptidos (datos no mostrados).

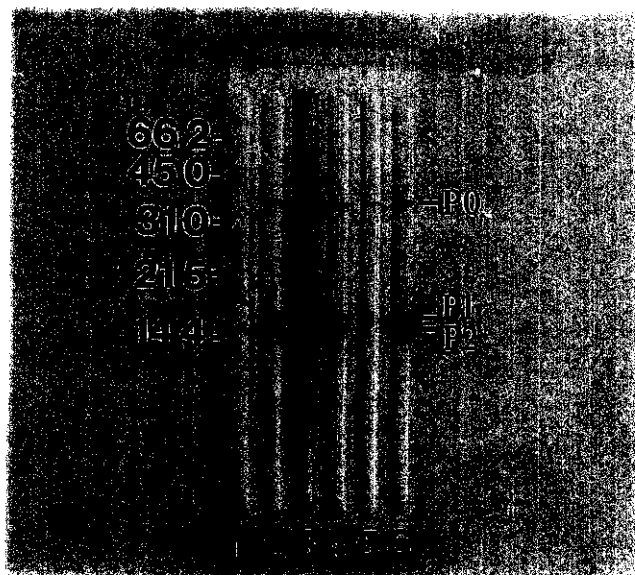


FIGURA 4. Autoanticuerpos anti-ribosomales (fosfoproteínas P0, P1 y P2) en pacientes con LES. *Calle 1: control negativo, Calle 2: control positivo, Calles 3-6: sueros con autoanticuerpos anti-ribosomales (1/100).*

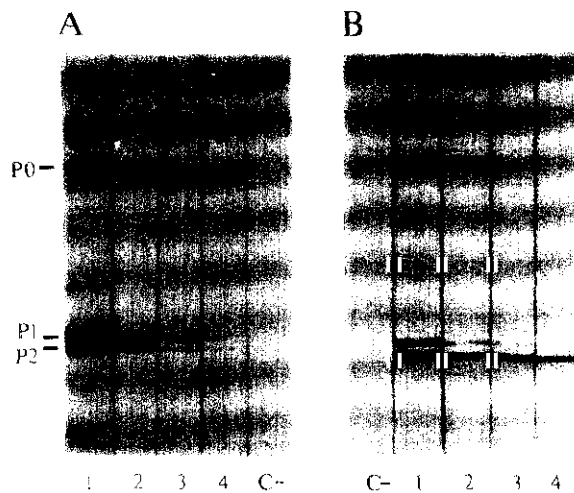


FIGURA 5. Reconocimiento de fosfoproteínas ribosomales sin renaturalizar (A), o renaturalizando el gel con Tris-20% glicerol (B). Las calles 1-4 representan un suero control a diferentes diluciones (1/100, 1/1000, 1/2000 y 1/4000). C-: control negativo.

2.B- Autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm y U1 RNP.

Utilizando sueros controles de especificidades de autoanticuerpos conocidas se comprobó la presencia de autoantígenos La/SSB (47,5 Kd), B'/B (29/28 Kd) y D (16 Kd) de Sm, y C (22 Kd) y 70 Kd de U1 RNP en el preparado de timo de conejo. Se analizaron 100 sueros de pacientes con LES de los que el 17% reconocían el polipéptido La/SSB, 21% el B'/B de Sm, 13% el D de Sm, 10% el C de U1 RNP, y 10% el polipéptido de 70 Kd asociado a la partícula U1 (Fig. 6).

La frecuencia de sueros positivos fue del 17% para anticuerpos anti-La/SSB, 28% para anti-Sm, y 14% para anti-U1 RNP. Algunos sueros reconocieron también los polipéptidos P0, P1 y P2 indicando la presencia de estas fosfoproteínas ribosomales en el preparado. Al igual que para los autoantígenos ribosomales, ningún suero de población normal reconoció estos polipéptidos (Fig. 7).

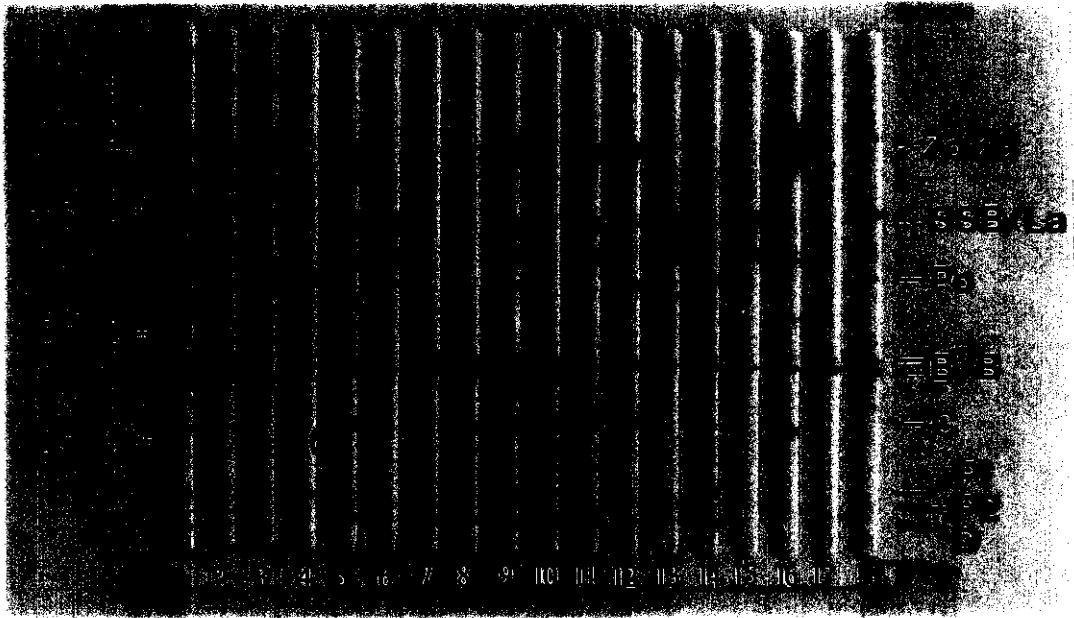


FIGURA 6. Reconocimiento de autoantígenos nucleares y citoplásmicos en pacientes con LES en el preparado de timo de conejo. Calles 1, 9 y 18: mezcla de sueros controles con autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm (polipéptidos B/B y D), y U1 RNP (polipéptidos C y de 70 Kd). Las restantes calles corresponden a sueros de pacientes con LES.

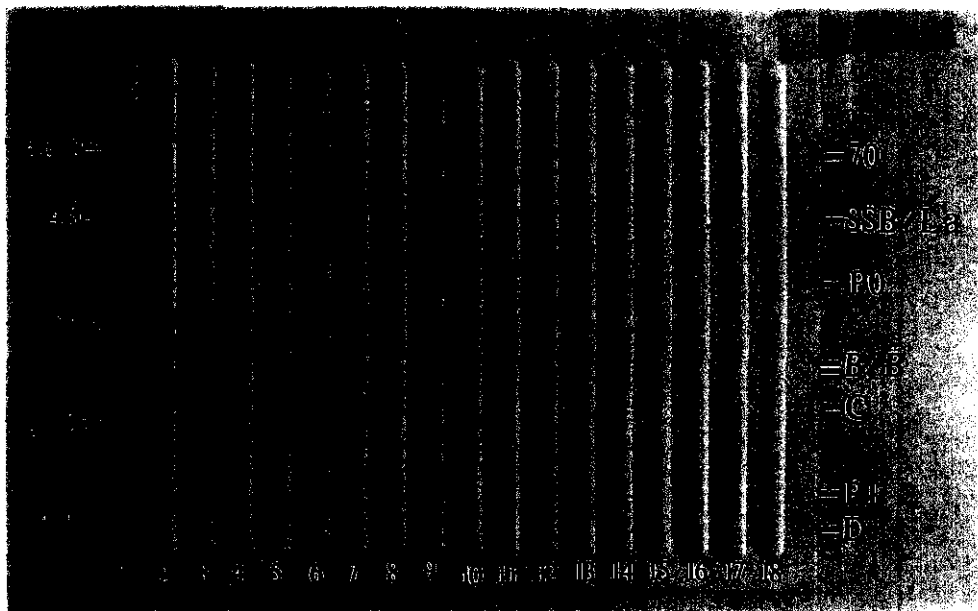


FIGURA 7. Sueros de población normal en el preparado de timo de conejo. Calles 1 y 9: mezcla de sueros controles con autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm y U1 RNP. Las restantes calles son sueros normales diluidos 1/50.

2.C- Autoanticuerpos anti-Ro/SSA.

La presencia de los polipéptidos de 60 y 52/54 Kd de Ro/SSA en el extracto de bazo humano se puso de manifiesto utilizando controles de especificidades conocidas. Para la caracterización de esta respuesta se emplearon 33 pacientes con LES, encontrándose reactividad principalmente frente al polipéptido de 52/54 Kd y en menor medida frente al de 60 Kd (Fig. 8). La frecuencia de sueros anti-Ro/SSA positivos fue del 27%. En población normal ningún suero reconoció Ro/SSA.

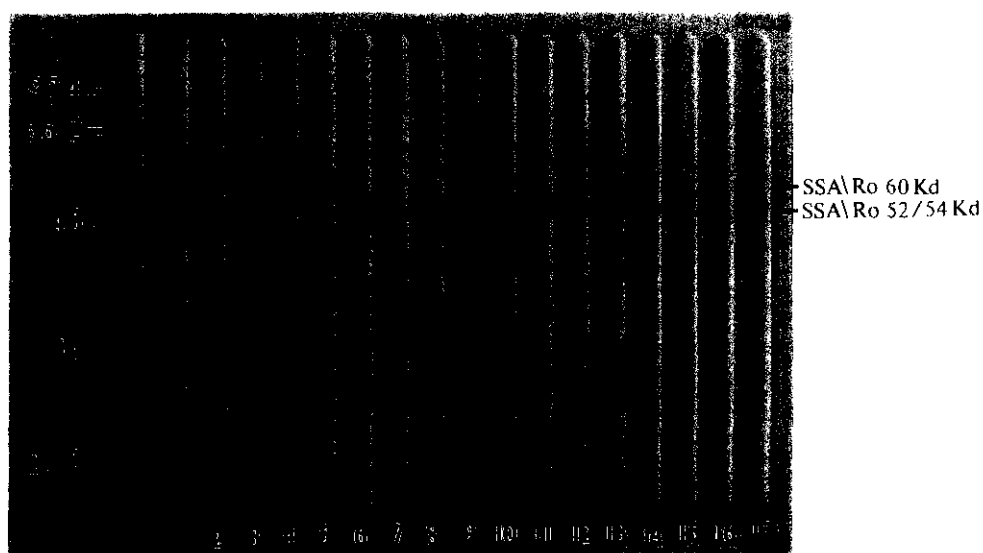


FIGURA 8. Autoanticuerpos anti-Ro/SSA por "Western blot" en pacientes con LES. Las calles 3,4 y 9 corresponden a sueros controles que reconocen los polipéptidos de 60 y 52/54 Kd de esta partícula. Calle 1: control negativo, calle 2: suero control con autoanticuerpos anti-La/SSB, calle 5: suero control con autoanticuerpos anti-La/SSB y Ro/SSA por contrainmunolectroforesis pero negativo o débilmente positivo por este ensayo. El resto de calles corresponden a sueros de pacientes con LES diluidos 1/100.

3-. Análisis de la respuesta de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP por ELISA con autoantígenos recombinantes en pacientes con LES y población normal. Correlación con la técnica de "Western blot".

Se emplearon 33 sueros de pacientes con LES que habían sido previamente estudiados por

"Western blot" no constituyendo, por tanto, una muestra aleatoria. En el análisis estadístico se incluyó además la población normal (n=30) analizada junto al grupo de pacientes parasitados (Fig. 3). Los resultados obtenidos por ELISA en pacientes con LES se indican en la Figura 9.

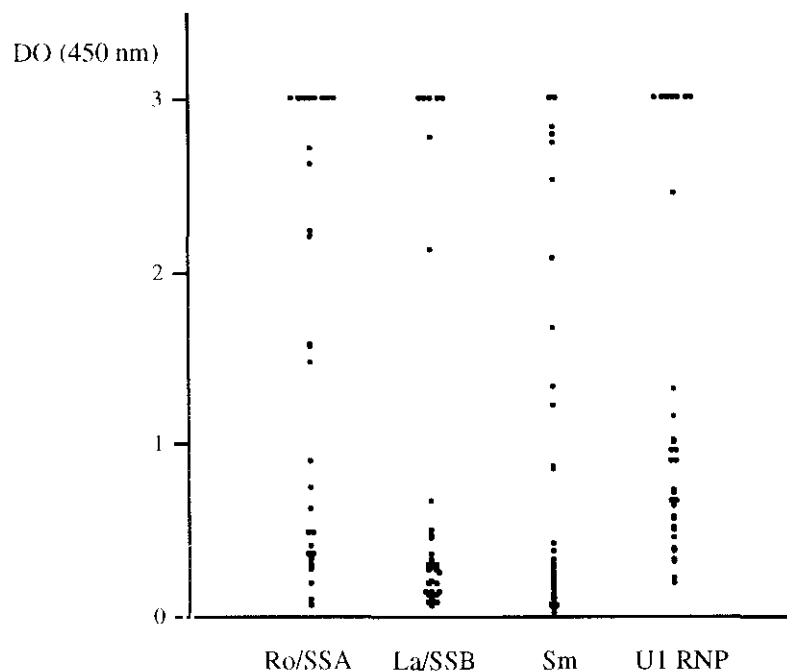


FIGURA 9. Resultados obtenidos en la población de pacientes con LES por ELISA con autoantígenos Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP recombinantes.

El grado de correlación entre los resultados de ELISA y "Western blot" fue moderado en la detección de anticuerpos anti-Ro/SSA ($k=0,474$; $p<0,001$) y anti-U1 RNP ($k=0,566$; $p<0,001$), y casi perfecto para anticuerpos anti-La/SSB ($k=0,871$; $p<0,001$) y anti-Sm ($k=0,833$; $p<0,001$) (Tabla VII). El análisis de la ausencia de correlación en la detección de anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-U1 RNP puso de manifiesto una predisposición en las medidas (estadístico de McNemar 13 y 11 respectivamente) cuyo significado parece deberse a una mayor tendencia del ELISA a proporcionar resultados positivos (Tabla VII).

TABLA VIIa. Resultados obtenidos por ELISA con autoantígenos recombinantes y "Western blot" en pacientes con LES y población normal.

	Ro/SSA				La/SSB				Sm				U1 RNP			
	+/+*	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
LES	9	11	0	13	8	1	0	24	14	1	3	15	11	10	0	12
Sueros normales	0	2	0	28	0	1	0	29	0	0	0	30	0	1	0	29

* Resultado por ELISA/resultado por "Western blot".

TABLA VIIb. Grado de correlación entre resultados de ELISA y "Western blot".

Autoantígeno	K	Grado de correlación
Ro/SSA*	0,474 (p<0,001)	Moderado
La/SSB	0,871 (p<0,001)	Casi perfecto
Sm	0,833 (p<0,001)	Casi perfecto
U1 RNP*	0,566 (p<0,001)	Moderado

*Estadístico de McNemar>3,8.

4- Análisis de la respuesta de autoanticuerpos anti-RNP por "Western blot" e inmunoprecipitación de ARN en pacientes parasitados.

Se analizó por "Western blot" de preparados de timo de conejo (autoantígenos La/SSB, Sm y U1 RNP) y bazo humano (Ro/SSA), la población de sueros en la que previamente se había detectado un alto porcentaje de autoanticuerpos por ELISA. Como se muestra en las Figs. 10 y 11, ningún suero reconoció estos autoantígenos aunque sí otros polipéptidos presentes en ambos extractos. Estos sueros tampoco reconocieron las fosfoproteínas P0, P1 y P2 en ribosomas purificados de cerebro de

rata (Fig. 12). En la Figura 13 se muestra que, aunque la movilidad relativa de los polipéptidos reconocidos por algunos sueros fue semejante a La/SSB (calles 3, 4, 6 y 7), PO (calles 3, 6 y 8) o B'/B de Sm (calle 3), el análisis por inmunoprecipitación de extractos marcados de células HeLa (^{32}P) tampoco pudo confirmar la presencia de anticuerpos anti-RNP.

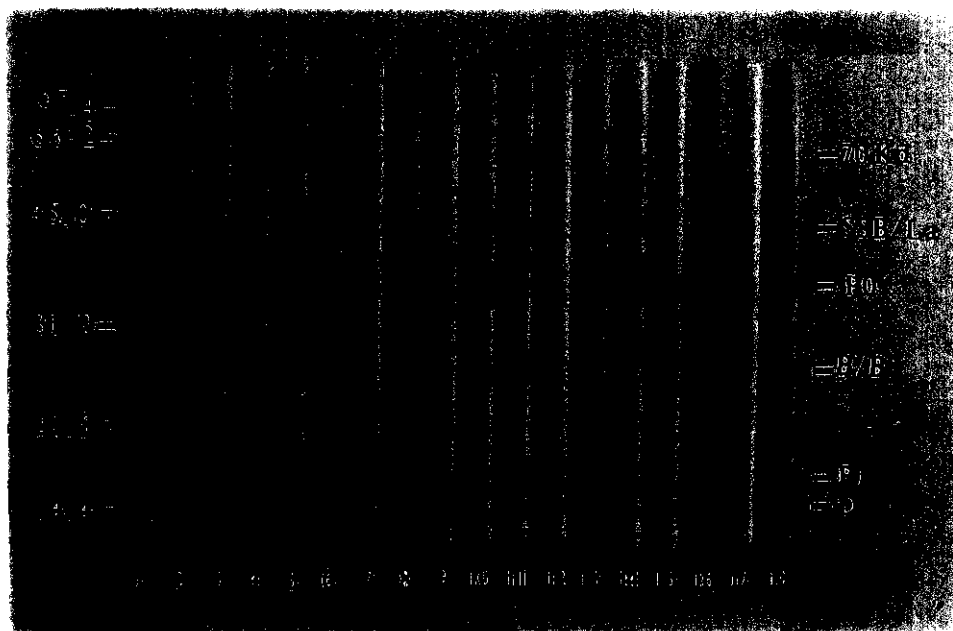


FIGURA 10. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm o U1 RNP por "Western blot" en el suero de pacientes parasitados. Calles I y II: mezcla de sueros controles con autoanticuerpos frente a estos tres autoantígenos. El resto de calles corresponden a sueros de la población de pacientes parasitados (1/50) en la que previamente se había detectado un alto porcentaje de positividades frente a estos autoantígenos por ELISA con autoantígenos recombinantes: P15 (calle 2), P16 (calle 3), P17 (calle 4), P18 (calle 5), P28 (calle 6), P20 (calle 7), P23 (calle 8), P24 (calle 9), P25 (calle 10), P3 (calle 12), P26 (calle 13), P2 (calle 14), P19 (calle 15), P27 (calle 16), P5 (calle 17), P6 (calle 18).

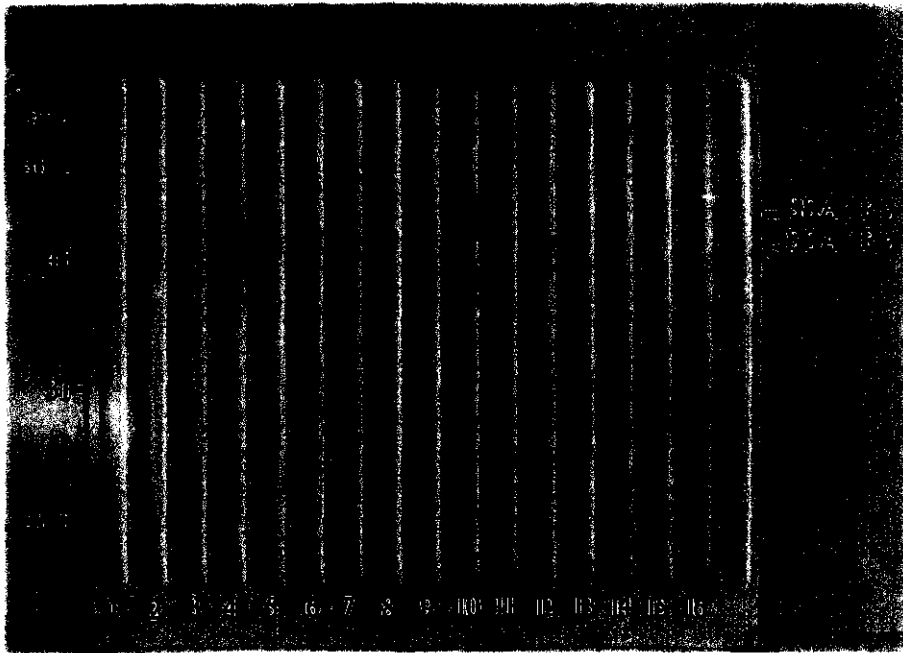


FIGURA 11. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-Ro/SSA por "Western blot" en pacientes parasitados. Calle 10: suero control con autoanticuerpos anti-Ro/SSA. Calles 1-9: sueros normales (1/50). El resto de calles corresponden a sueros de pacientes parasitados (1/50) en los que previamente se había detectado un alto porcentaje de positividad frente a este autoantígeno por ELISA con autoantígenos recombinantes: P23 (calle 11), P24 (calle 12), P25 (calle 13), P26 (calle 14), P28 (calle 15), P27 (calle 16), P29 (calle 17).



FIGURA 12 (pág. anterior). Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-ribosomales en pacientes parasitados. Calles 1 y 7: suero control con autoanticuerpos anti-P0, P1 y P2. El resto de calles corresponden a sueros de pacientes parasitados: P12 (calle 2), P4 (calle 3), P1 (calle 4), P3 (calle 5), P28 (calle 6), P20 (calle 8), P26 (calle 9), P21 (calle 10), P15 (calle 11), P14 (calle 12).

PANEL A

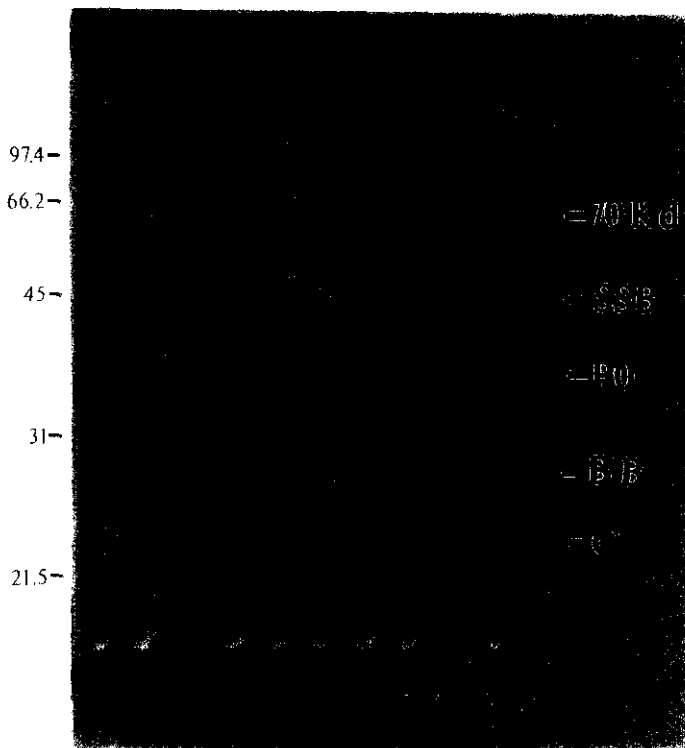


Figura 13 (A); ver leyenda en página siguiente

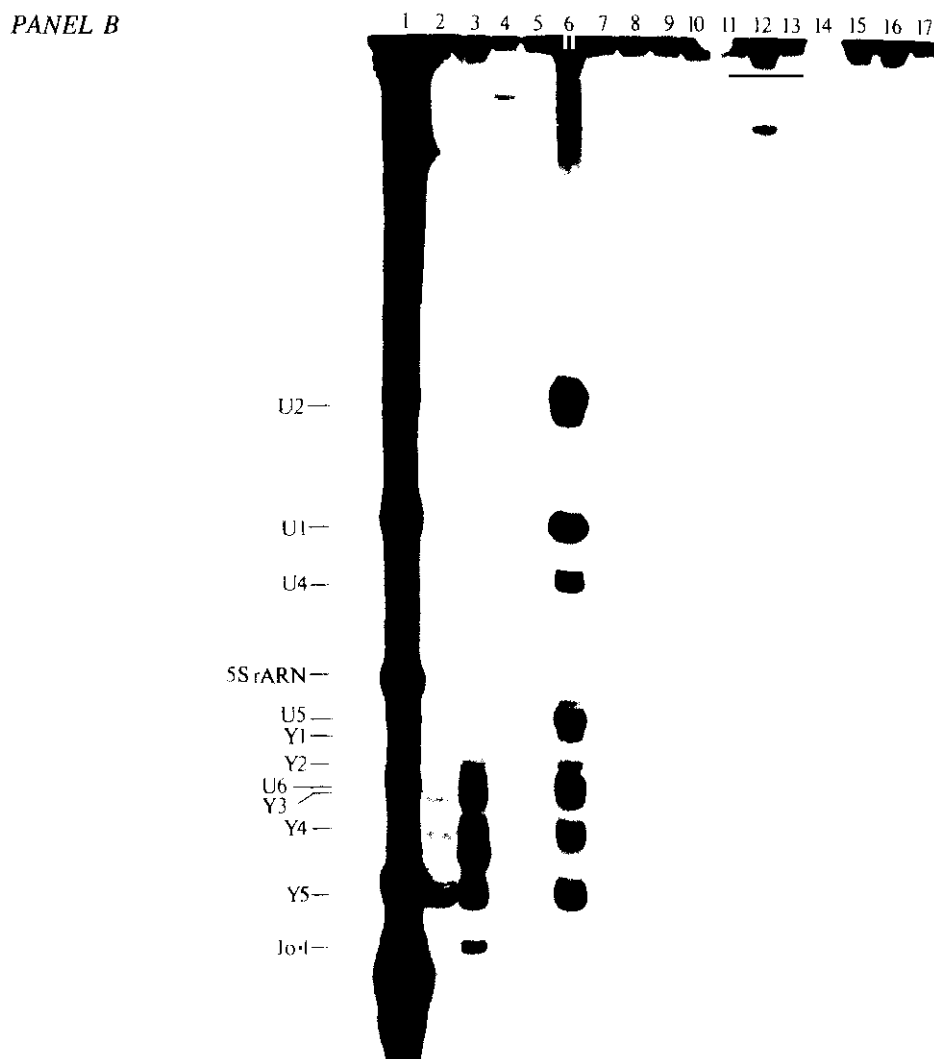


FIGURA 13. PANEL A: Calles 1 y 9: mezcla de sueros control con autoanticuerpos anti-La/SSB, Sm, U1 RNP o ribosomales. Las restantes calles corresponden a sueros de pacientes parasitados: P3 (calle 2), P4 (calle 3), P9 (calle 4), P10 (calle 5), P29 (calle 6), P31 (calle 7), P32 (calle 8).

PANEL B: Análisis de la existencia de autoanticuerpos anti-RNP en pacientes parasitados por inmunoprecipitación de ARN. **Calle 1:** ARN total; **calle 2:** control positivo anti-Ro/SSA (precipita los ARN Y3, Y4 e Y5 asociados a polipéptidos Ro/SSA); **calle 3:** control positivo anti-Ro/SSA y La/SSB (ARN Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5 asociados a polipéptidos Ro/SSA, y 5S, e Y5 asociados al polipéptido La/SSB); **calles 4 y 5:** sueros anti-Ro/SSA débiles; **calle 6:** control positivo anti-Ro/SSA y Sm (ARN asociados a Ro/SSA, y ARN U2, U1, U4, U5, U6 de snRNP). El resto de calles corresponden a pacientes parasitados: P26 (calle 7), P27 (calle 8), P28 (calle 9), P32 (calle 10), P31 (calle 11), P29 (calle 12), P10 (calle 13), P9 (calle 14), P4 (calle 15), P3 (calle 16), suero normal (calle 17).

III-. Estudio comparativo de la respuesta a laminina (LMN) en pacientes parasitados (filariasis), LES y población normal.

El análisis de la reactividad de sueros de pacientes parasitados por IFI sobre criocortes de tejido de rata, puso de manifiesto la existencia de anticuerpos dirigidos a antígenos de MEC. En ocho sueros se identificó un patrón semejante al obtenido con un antisuero policlonal anti-LMN (Fig. 2). La mayoría de éstos sueros correspondieron a pacientes parasitados por nemátodos de la Superfamilia Filarioidea, por lo que se analizó ésta respuesta en 30 pacientes con filariasis (Tabla VI), y se estudió comparativamente junto a una población de pacientes con LES y otra de controles normales.

1-. Análisis de la pureza de la preparación de LMN.

El grado de pureza se determinó por tinción con Coomassie de un gel de poliacrilamida-SDS (Fig. 14).



FIGURA 14. Análisis de la pureza de la preparación de LMN de sarcoma murino. **Panel 1:** La tinción con Coomassie de un gel de poliacrilamida-SDS permitió identificar las cadenas pesadas A (400 Kd) y ligeras B1 y B2 (230 y 220 Kd) conforme a lo descrito previamente (Sabbaga et al., 1989). **Panel 2:** Estas cadenas fueron también detectadas después de transferir a membrana de nitrocelulosa.

2-. Análisis de la respuesta de anticuerpos anti-LMN de clase IgG por ELISA en filariasis, LES y población normal.

Se analizaron 30 pacientes con filariasis, 87 pacientes con LES y 30 sueros de población normal. En cada ensayo se introdujeron controles negativos y sueros positivos conocidos. El coeficiente de variación de un resultado positivo fue del 16%. Los valores de DO obtenidos fueron de $0,734 \pm 0,07$ en filariasis, $0,263 \pm 0,03$ en pacientes con LES y $0,120 \pm 0,04$ en población normal. De esta manera, la respuesta de anticuerpos anti-LMN se encontró elevada en filariasis y LES frente al grupo de población normal ($p < 0,0001$ y $p < 0,01$ respectivamente).

Utilizando dos desviaciones estándar sobre la media de los valores de DO obtenidos en 30 sueros de población normal como corte para determinar niveles elevados de anticuerpos anti-LMN (corte: 0,539), el 66,7% de pacientes con filariasis (20/30), 13,8% de pacientes con LES (12/87), y dos sueros normales (6,6%) presentaron estos anticuerpos. Los títulos fueron mayores en filariasis, siendo semejantes en LES y los sueros normales positivos (Fig. 15).

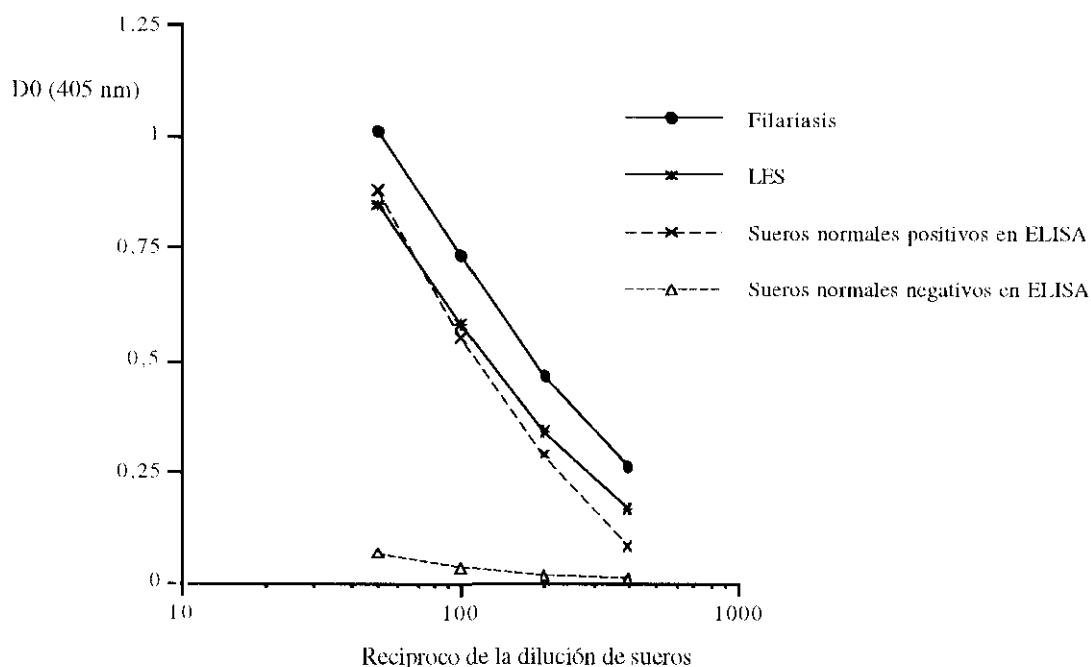


FIGURA 15. Anticuerpos anti-LMN. Los datos se expresan como la media de valores de DO obtenidos en pacientes con filariasis ($n=19$), LES ($n=12$), sueros normales positivos en ELISA ($n=2$), y sueros normales negativos ($n=8$).

La concentración de IgG media en los sueros positivos de cada población fue de 2480 ± 898 mg/dl en filarías, 1400 ± 401 mg/dl en LES, y 948 ± 152 mg/dl en los sueros normales positivos por ELISA. Los niveles de IgG en LES y sueros normales positivos no difirieron significativamente ($p > 0,1$, n.s.), aunque en LES éstos se situaron en el límite de la normalidad.

El estudio de las subclases de IgG anti-LMN indicó una respuesta IgG1 en los tres grupos aunque en filarías también fue IgG2 e IgG3 (Tabla VIII).

TABLA VIII. Distribución de subclases de IgG anti-LMN en sueros positivos y controles normales.

	LES (n=10)	Filarías (n=17)	Controles normales (n=2) ¹	Controles normales (n=28) ²
IgG1	0,20 \pm 0,022 (0,304-0,098)*	0,283 \pm 0,04 (0,54-0,09)*	0,258 \pm 0,086 (0,344-0,171)#	0,016 \pm 0,002 (0,034-0)
IgG2	0,004 \pm 0,001 (0,013-0)	0,205 \pm 0,07 (0,896-0)**	0,021 \pm 0,02 (0,041-0)	0,031 \pm 0,005 (0,074-0)
IgG3	0,023 \pm 0,008 (0,08-0)	0,133 \pm 0,04 (0,438-0)**	0,01 \pm 0,01 (0,02-0)	0,041 \pm 0,004 (0,069-0)
IgG4	0,073 \pm 0,007 (0,108-0,043)	0,09 \pm 0,02 (0,318-0)	0,067 \pm 0,066 (0,133-0)	0,016 \pm 0,002 (0,047-0)

Nota: Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. Entre paréntesis figuran los valores mayores y menores de DO.

¹Controles normales positivos para anticuerpos anti-LMN

²Controles normales negativos para anticuerpos anti-LMN

* $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ frente a 28 controles normales.

3-. Estudio comparativo de la capacidad de unión de IgG anti-LMN en filarías y en pacientes con LES.

Se purificó IgG de una mezcla de sueros de pacientes con LES o filarías positivos en ELISA, se ajustaron a la misma concentración de proteína y se titularon diluciones seriadas. Como se muestra en la Fig. 16, la absorbancia de la fracción IgG del grupo de pacientes con filarías fue superior a la obtenida en el grupo de pacientes con LES. Ambas curvas de unión fueron similares, ($\rho = 1$, $p < 0,001$) sugiriendo que esta mayor absorbancia podría deberse a una mayor cantidad de IgG anti-LMN en el grupo de pacientes parasitados y no a una capacidad de unión o afinidad de anticuerpo diferente.

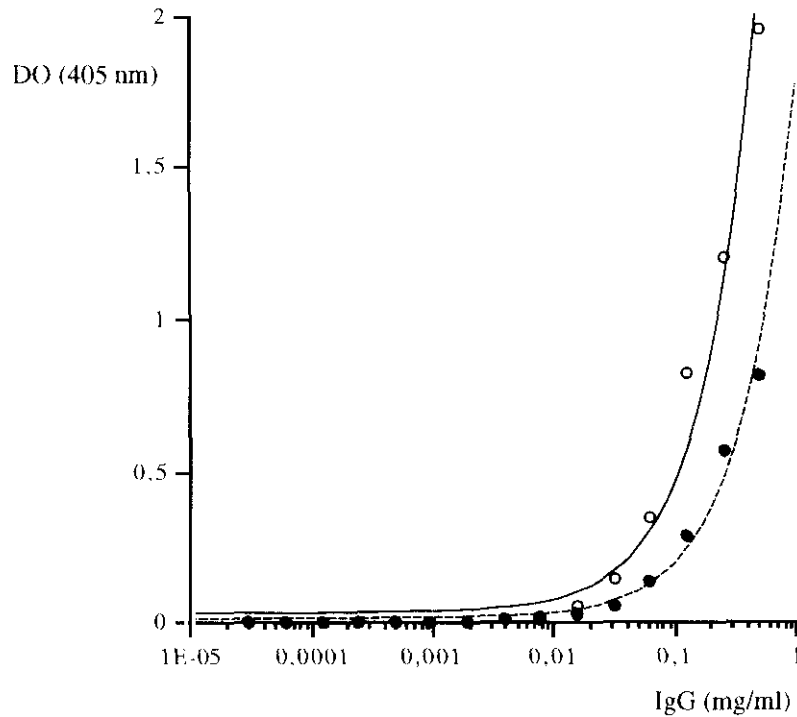
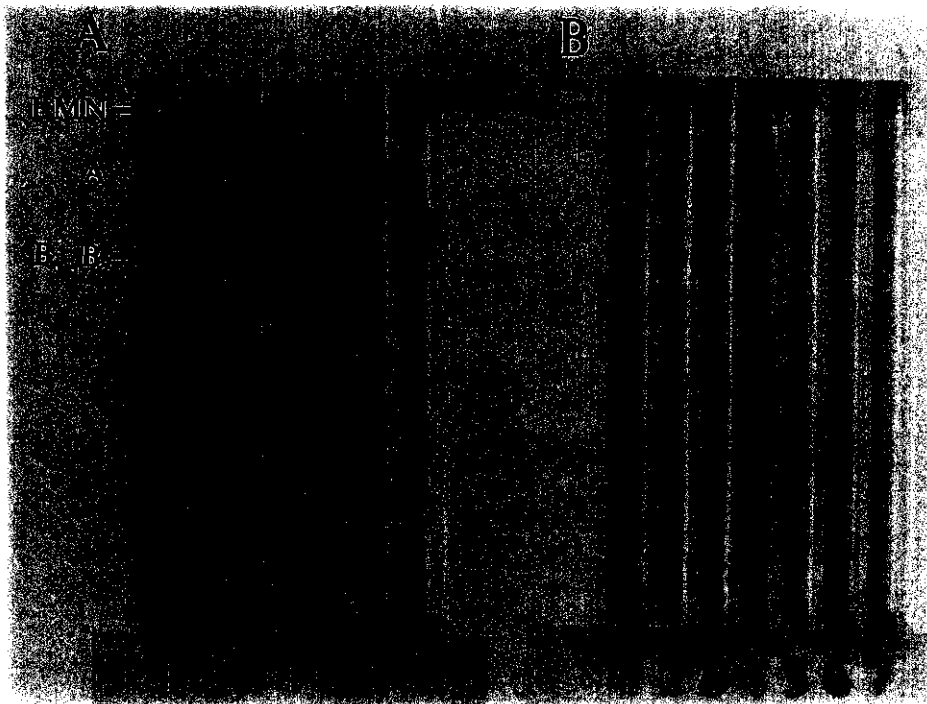


FIGURA 16. Curvas de unión a LMN en la fracción de IgG purificada de una mezcla de sueros de pacientes con LES (línea discontinua) o filariasis (línea continua). Las dos curvas de unión son semejantes ($\rho=1$, $p<0,001$).

La capacidad de unión de estos anticuerpos a la propia LMN y a FN se analizó por medio de un ELISA competitivo. Para este ensayo, se preincubaron durante toda la noche a 4° C una mezcla de fracciones IgG (ajustadas a la misma actividad anti-LMN en ambos grupos (DO 405 nm)) y competidor en varias concentraciones, añadiéndose posteriormente a pocillos de microtitulación preincubados con LMN. Como se muestra en la Fig. 17, sólo la LMN inhibió la unión de estos anticuerpos. La concentración de LMN requerida para obtener el 50% de inhibición fue en ambos casos similar (8 $\mu\text{g/ml}$ en LES y 10 $\mu\text{g/ml}$ en pacientes con filariasis) apoyando una afinidad similar en ambos grupos de anticuerpos anti-LMN. Esta actividad no se inhibió con FN (Fig. 17).

El análisis de la reactividad frente a esta glicoproteína por medio de un ensayo de "Western blot" permitió demostrar la presencia de estos anticuerpos en el suero de pacientes parasitados y en los controles normales positivos en ELISA, pero no en pacientes con LES (Fig. 18). En este experimento se detectaron algunas bandas que no correspondieron a cadenas pesada o ligeras de la LMN, pudiendo demostrarse por tinción por Coomassie que estos polipéptidos aparecen como consecuencia del calentamiento de la preparación de LMN (dato no mostrado).



*FIGURA 18. Análisis de la presencia de anticuerpos anti-LMN por "Western Blot" Algunos sueros reconocen las típicas bandas obtenidas con LMN EHS bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, incluyendo la cadena pesada A (400 Kd) y ligeras B1 y B2 (230 y 220 Kd) (Sabbaga et al., 1989). La banda de alto peso molecular probablemente corresponde a LMN no reducida detectada como consecuencia de tratamiento reductor (5 minutos a 37° C) que origine una reducción incompleta de la molécula. **Panel A:** pacientes parasitados (calles 1-5) y sueros normales positivos en ELISA (calles 6, 7). **Panel B:** algunos sueros de pacientes con LES positivos en ELISA, no reconocen cadena pesada o ligeras.*

Con el fin de analizar si una respuesta anti-polisacárido podría explicar las diferencias en reactividad observadas por "Western blot", se trató la LMN con periodato sódico a distintas concentraciones y en oscuridad, analizándose la reactividad en IgG purificada de la mezcla de sueros de pacientes con LES o pacientes parasitados. Como se muestra en la Fig. 19, el tratamiento de LMN con periodato resultó en una disminución del reconocimiento similar en ambos grupos. El tratamiento con 5 mM casi no afectó al reconocimiento del antígeno, mientras que 10 mM y 15 mM proporcionaron una disminución de reactividad similar. Sin embargo, esta disminución no fue en ningún caso completa, sugiriendo el reconocimiento de epítomos polipeptídicos.

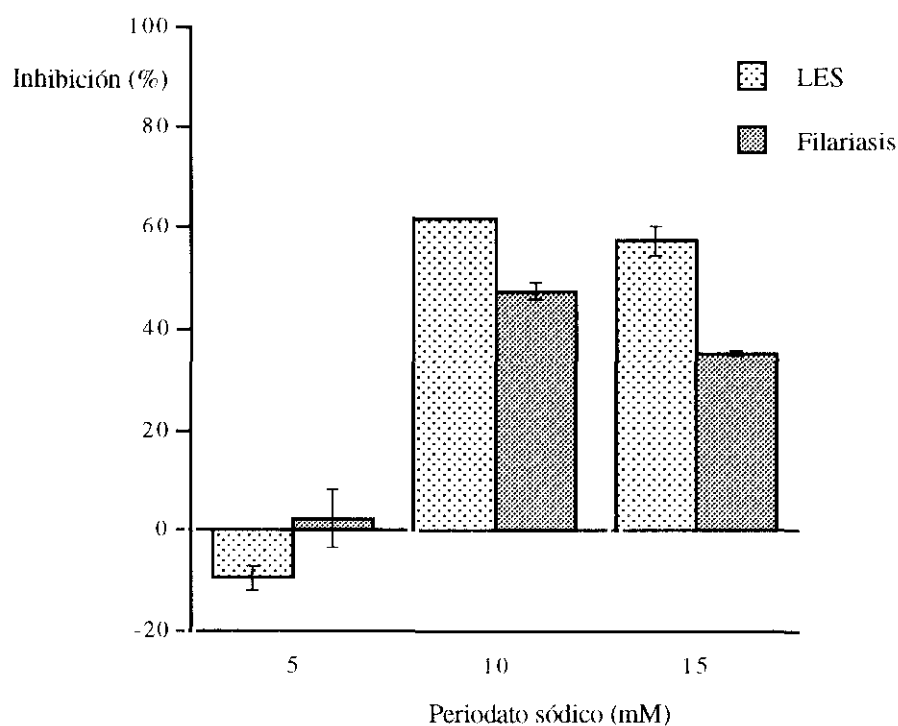


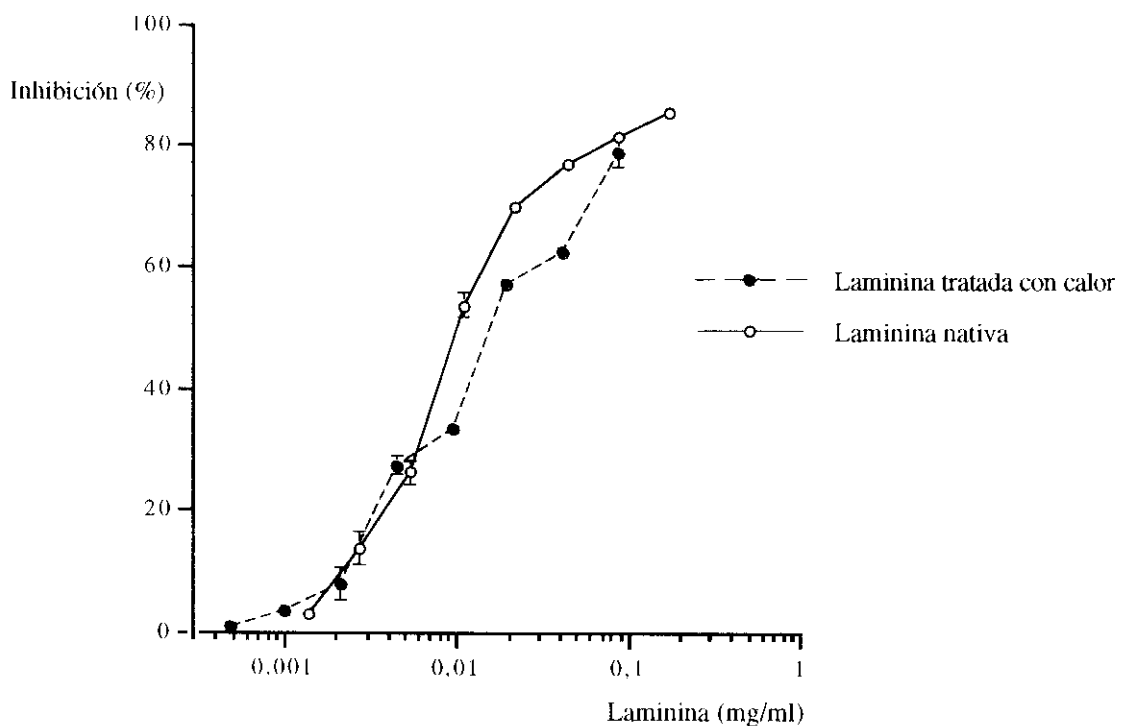
FIGURA 19. Modificación de carbohidratos de LMN. Fracciones de IgG purificadas a partir de una mezcla de sueros de pacientes con LES o filariasis y ajustadas a la misma actividad anti-LMN (DO 405 nm: 0,225 mg/ml en LES y 0,1 mg/ml en filariasis), se hicieron reaccionar con LMN tratada con diferentes concentraciones de periodato sódico (5, 10 y 15 mM). Los resultados se expresan como porcentaje de disminución de DO a 405 nm: $(1 - (DO\ LMN\ tratada / DO\ LMN\ no\ tratada)) \times 100$.

4-. Capacidad de los anticuerpos anti-LMN de reconocer LMN sometida a diferentes tratamientos desnaturalizantes y renaturalizantes.

Con el fin de determinar si las diferencias encontradas en "Western blot" eran debidas a la existencia de requerimientos estructurales en la LMN para su reconocimiento por los sueros, se evaluó la reactividad con LMN nativa y desnaturalizada.

La capacidad de estos anticuerpos de reconocer LMN desnaturalizada se analizó en primer lugar por un ensayo de ELISA competitivo. Como se muestra en la Fig. 20, la concentración de LMN nativa o desnaturalizada por calor (100° C durante 4 minutos) requerida para obtener el 50% de inhibición con la fracción IgG de pacientes con filariasis fue semejante (10 y 15 µg/ml respectivamente). Aunque en el grupo de pacientes con LES las dos curvas de unión fueron similares ($\rho=1$, $p<0,05$), la concentración de LMN desnaturalizada requerida para obtener el 50% de inhibición fue cuatro veces menor que para LMN nativa (2 y 8 µg/ml respectivamente).

Filariasis



LES

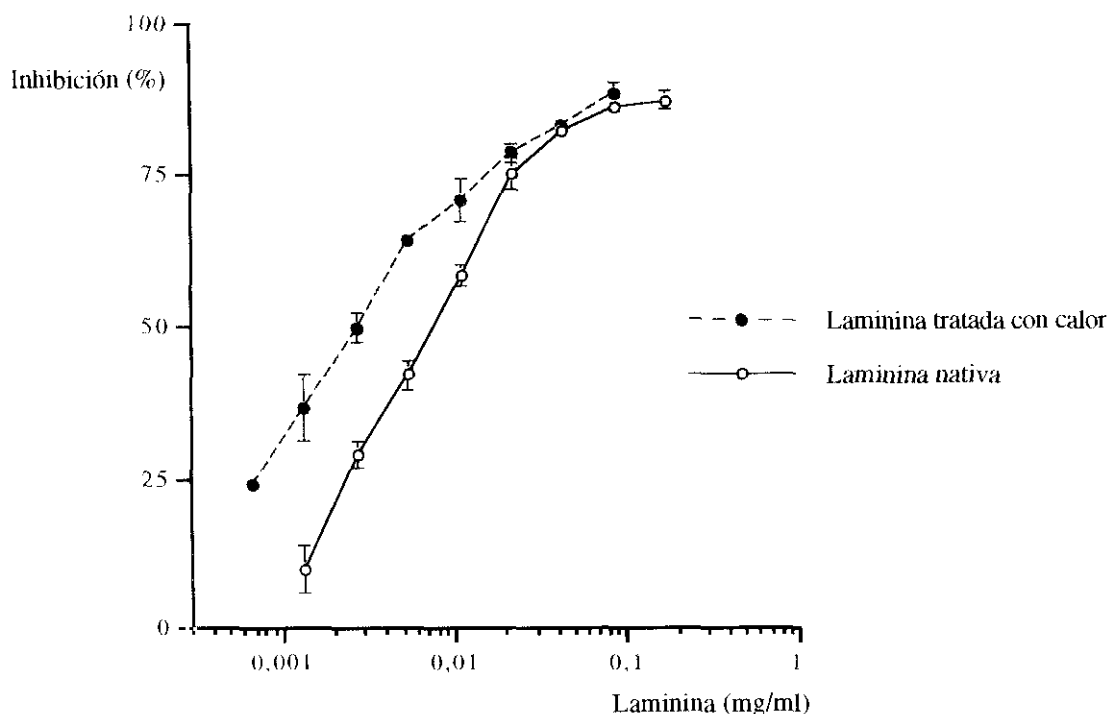


FIGURA 20. ELISA competitivo con LMN nativa y desnaturalizada con calor (100° C durante 4 minutos). Fracciones de IgG purificadas a partir de una mezcla de sueros de pacientes con filariasis o con LES, y ajustadas a la misma actividad anti-LMN como en la Fig. 17, se preincubaron con concentraciones variables de LMN nativa (línea continua) o tratada con calor (línea discontinua). La mezcla se hizo reaccionar con LMN por ELISA, expresándose los resultados como porcentaje de inhibición.

La reactividad con LMN sometida a diferentes tratamientos (nativa, desnaturalizada por calor, desnaturalizada con SDS/ β -mercaptoetanol, o SDS sólo) fue analizada por "Dot blot". Como se observa en la Fig. 21, una mezcla de sueros de pacientes con filariasis reconocieron LMN sometida a todos los tratamientos (panel A, nótese que las aplicaciones en las calles 3 y 5 son más anchas probablemente debido al efecto del SDS). Por el contrario, una mezcla de sueros de pacientes con LES, sólo reconocieron LMN nativa y tratada con calor (panel B, calles 1 y 2). Los anticuerpos anti-

LMN detectados por ELISA en los controles normales, reaccionaron con LMN nativa y débilmente con la forma desnaturalizada por SDS/ β -mercaptoetanol (panel C, calles 1 y 3). Una mezcla de sueros negativos por ELISA no reconocen LMN en ningún caso (panel D).

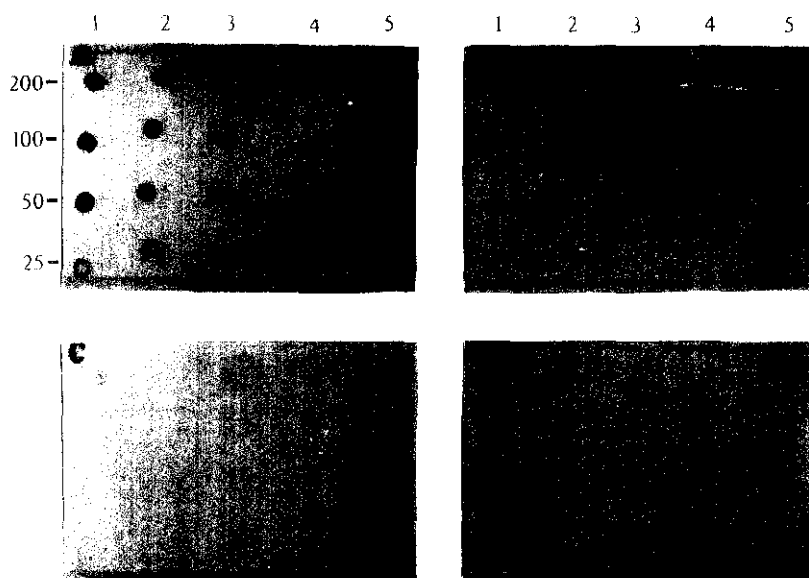


FIGURA 21. Ensayo de "Dot blot" con 4 μ l de LMN a diferentes concentraciones (200, 100, 50 y 25 μ g/ml) y sometida a varios tratamientos. Calle 1: sin tratar (nativa), calle 2: tratada con calor (100° C durante 4 minutos), calle 3: desnaturalizada con 1%SDS/10% β -mercaptoetanol, calle 4: BSA, calle 5: desnaturalizada con 1%SDS.

Panel A: mezcla de sueros de pacientes parasitados; **panel B:** mezcla de sueros de pacientes con LES; **panel C:** mezcla de sueros normales positivos en ELISA; **panel D:** mezcla de sueros normales negativos.

Estas diferencias de reactividad fueron también encontradas por "Western blot" con LMN desnaturalizada y renaturalizada. Como se muestra en la Fig. 22, una mezcla de sueros de pacientes con filarías reconocieron tanto las formas desnaturalizadas como las renaturalizadas con 3% NP-40 o Tris-20% glicerol (Paneles A, B y C, segunda calle en cada panel), mientras que una mezcla de sueros de pacientes con LES reconocieron exclusivamente las formas renaturalizadas (paneles B y C,

tercera calle de cada panel). Por otra parte, los anticuerpos anti-LMN detectados en los sueros normales sólo pudieron ser demostrados cuando la renaturalización se llevó a cabo con 3% NP-40 (panel B, cuarta calle). En este experimento, la cadena ligera de LMN no fue detectada por ningún suero pudiendo ser debido al tratamiento reductor de LMN anterior a su aplicación en el gel de poliacrilamida (5 min. a 37° C).

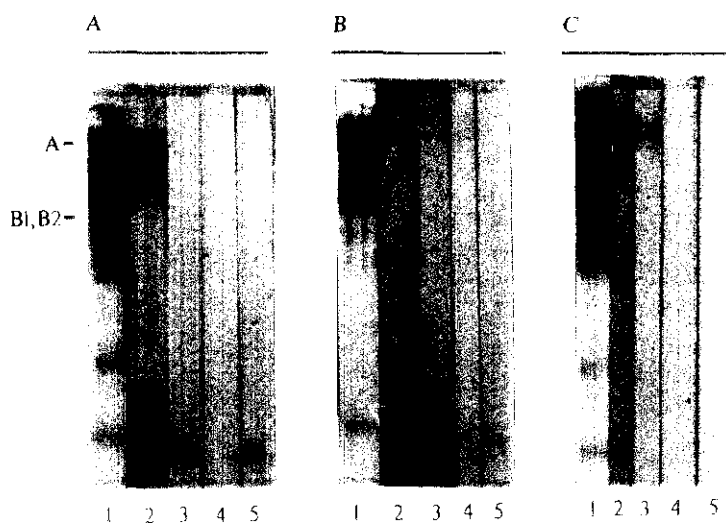


FIGURA 22. Análisis de la reactividad con LMN desnaturalizada y renaturalizada. **Panel A:** LMN desnaturalizada, **Panel B:** LMN renaturalizada con 3% NP-40, **Panel C:** LMN renaturalizada con Tris-20% glicerol.

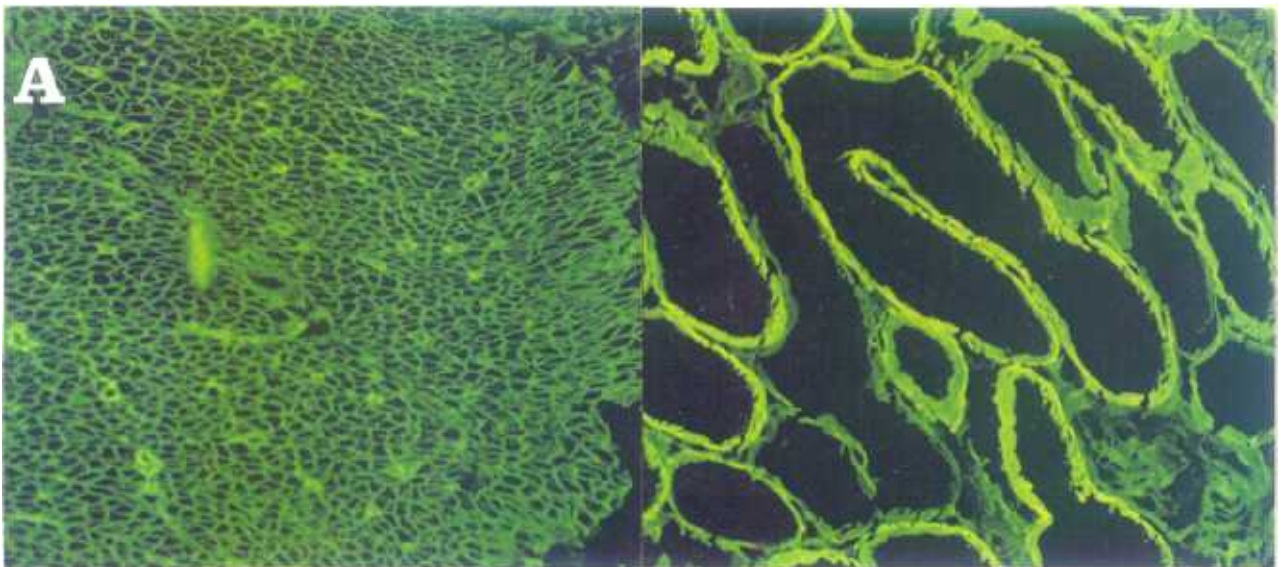
Calle 1: anticuerpo policlonal anti-LMN, calle 2: mezcla de sueros de pacientes con filariasis, calle 3: mezcla de sueros de pacientes con LES, calle 4: suero control positivo en ELISA, calle 5: mezcla de sueros normales negativos en ELISA.

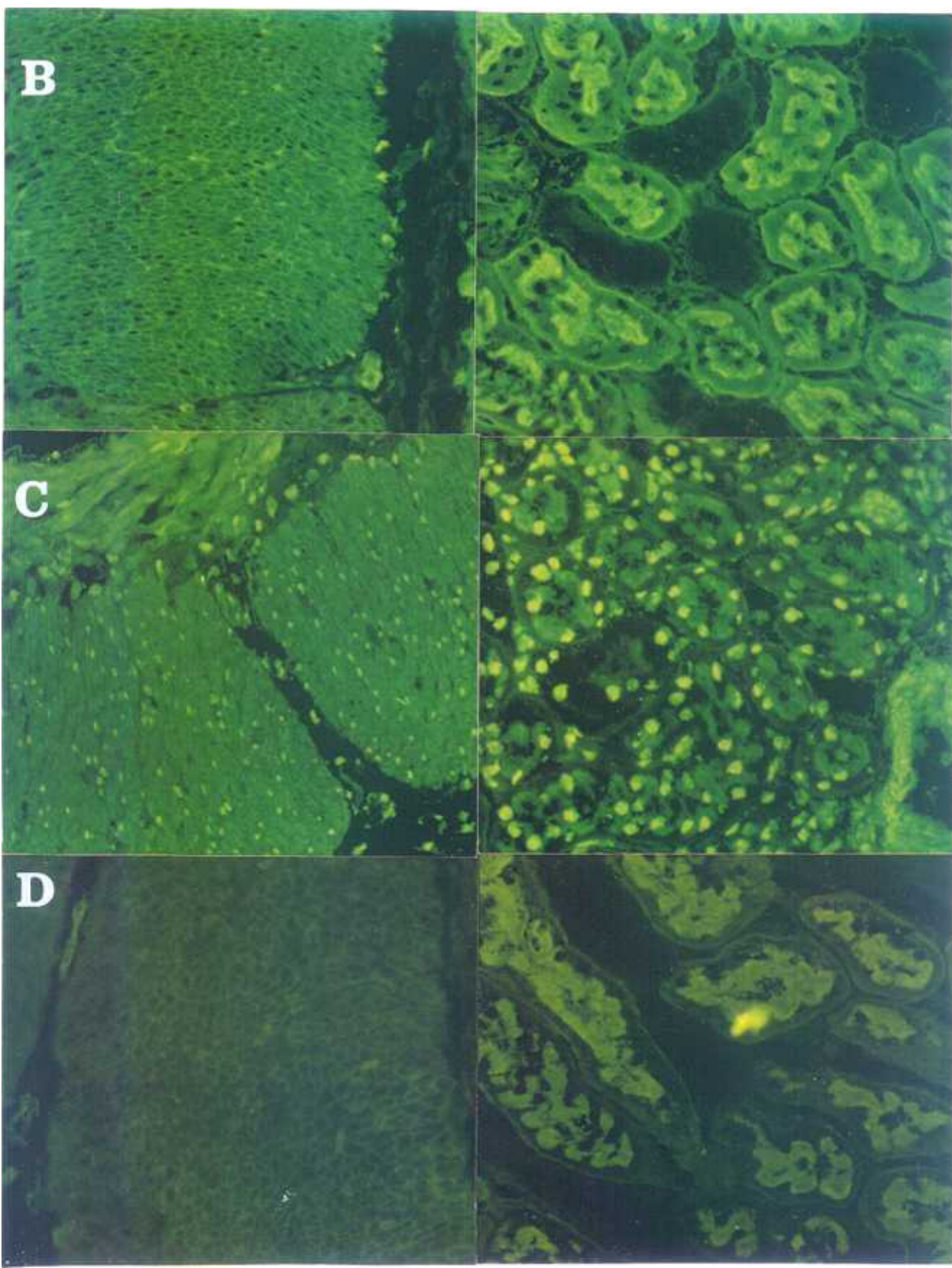
5-. Reactividad frente a componentes de matriz extracelular por Inmunofluorescencia Indirecta.

Con el fin de analizar la reactividad frente a componentes de MEC, se estudiaron todos los sueros que dieron positivos en ELISA. El patrón de fluorescencia identificado con el suero de pacientes con

filariasis fue muy similar al obtenido con el antisuero policlonal anti-LMN. Estos patrones sólo se identificaron en aquellos sueros que presentaron mayores títulos en ELISA. En la Fig. 23 se observa el patrón obtenido con IgG purificada de uno de estos sueros (P10), comprobándose una reactividad similar a la obtenida con el policlonal anti-LMN en musculatura lisa de estómago y membrana basal de túbulo renales (Paneles A y B). Este patrón fue identificado también aunque con menor intensidad con IgG purificada (80 µg) de un suero normal positivo en ELISA (Panel D), pero no de una mezcla de sueros negativos (Panel E).

Por otro lado, en pacientes con LES no se pudo identificar el mismo patrón alrededor de las células de musculatura lisa del estómago, aunque algunos de estos sueros poseían títulos semejantes a pacientes con filariasis que sí eran positivos en IFI. Sí se pudo detectar aunque débilmente, patrón de fluorescencia alrededor de los túbulo renales. En la Fig. 23 (Panel C) se observa el patrón obtenido con IgG purificada de suero de un paciente con LES que presentó títulos altos de anticuerpos anti-LMN en ELISA (1/400).





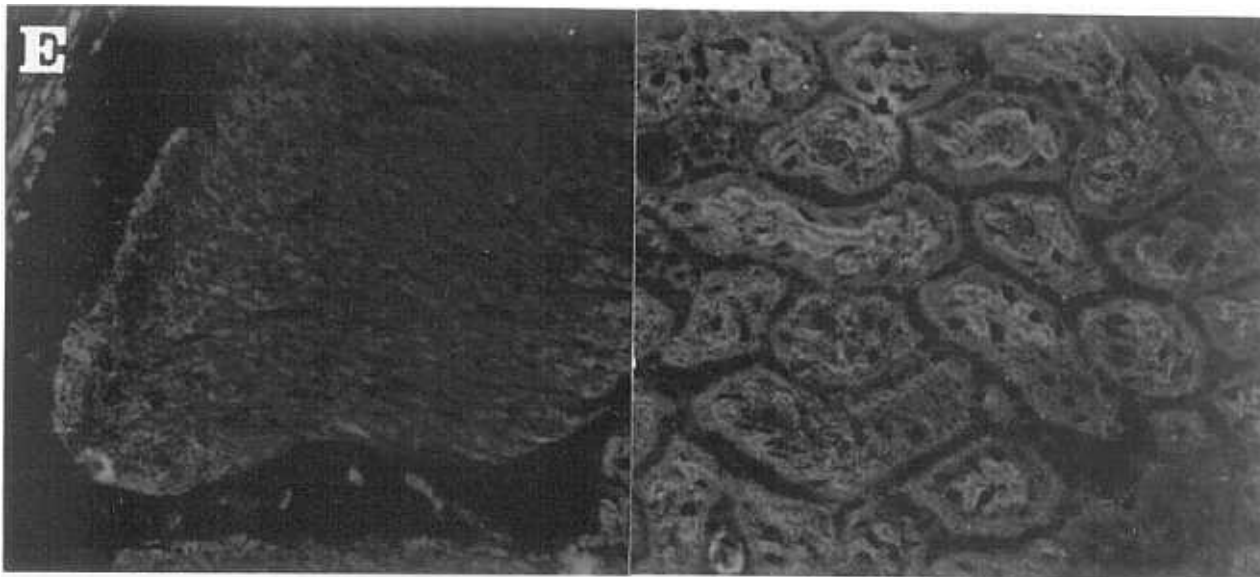


FIGURA 23. Patrones de fluorescencia obtenidos en criocortes de estómago (izquierda) y riñón (derecha) con un antisuero policlonal anti-LMN (1/50, **panel A**), e IgG purificada de un paciente con filariasis (40 μ g, **panel B**), de un paciente con LES (40 μ g, **panel C**), un suero normal positivo en ELISA (80 μ g, **panel D**) o una mezcla de sueros normales negativos (80 μ g, **panel E**).

6-. Análisis de la correlación entre los niveles de anticuerpos anti-LMN y autoanticuerpos anti-ADN de hélice sencilla.

Debido a que en estudios previos se ha demostrado que anticuerpos monoclonales anti-ADN derivados de modelos de lupus murinos son capaces de reconocer LMN (Sabbage *et al.*, 1989), se evaluó la presencia de estos autoanticuerpos así como la correlación entre sus niveles y la actividad anti-LMN. La preparación de ADN de timo de ternera se sometió a un proceso de repurificación para disminuir la contaminación por proteínas. Así, el cociente de DO 260/280 que antes de la repurificación era de 1,23, después fue de 1,73.

Se analizó la presencia de estos autoanticuerpos en la mayoría de los sueros que presentaron anticuerpos anti-LMN por ELISA. La correlación entre los resultados de ambos ensayos se muestra

en la Fig. 24. En LES, la presencia de anticuerpos anti-LMN correlacionó significativamente con la capacidad de reconocer ADN de hélice sencilla ($r=0,801$, $p<0,025$), mientras que en filariasis no se encontró correlación significativa entre ambas actividades ($r=0,273$, $p>0,1$, n.s.).

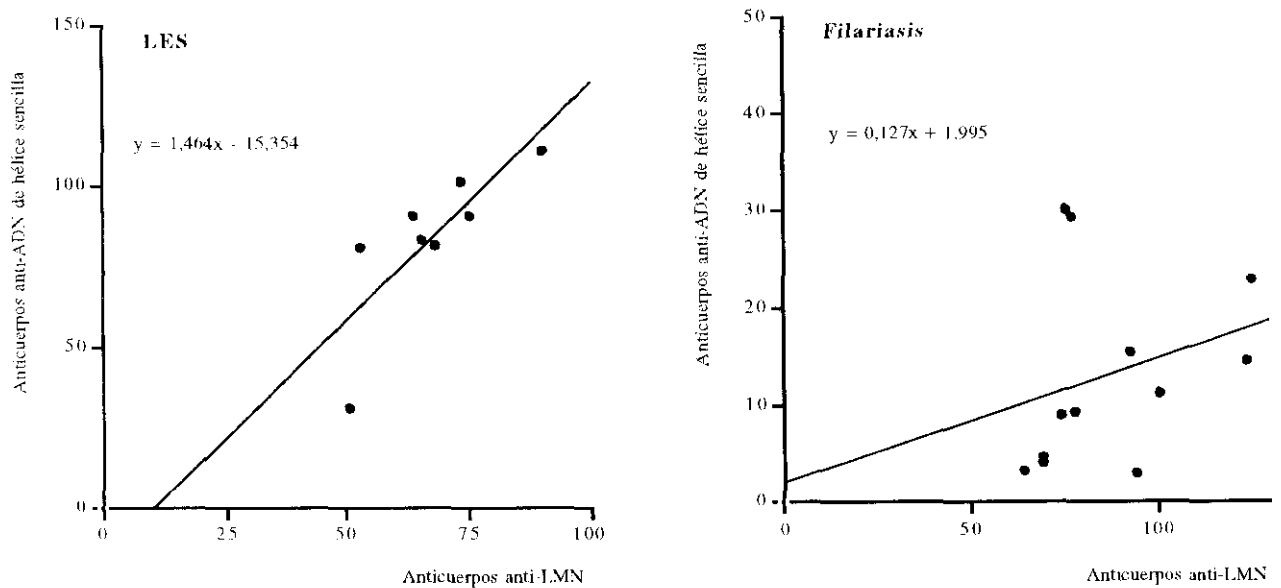


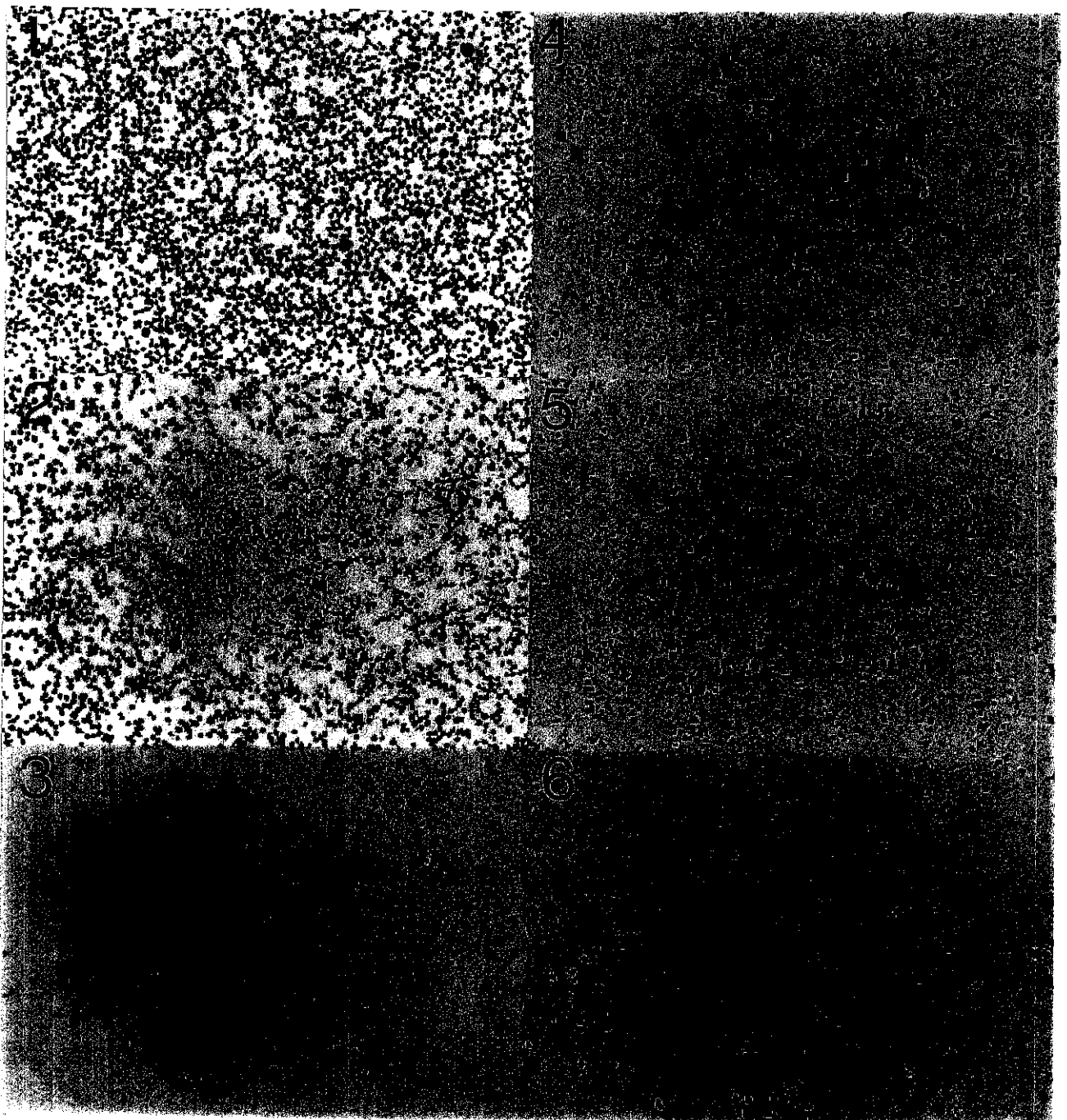
FIGURA 24. Correlación entre los niveles de anticuerpos anti-LMN y anticuerpos anti-ADN de hélice sencilla en filariasis ($n=12$) y en LES ($n=8$) a la dilución 1/50. Los resultados se expresan como porcentaje de un suero control positivo incluido en cada placa de microtitulación.

7-. Capacidad de los anticuerpos anti-LMN de inhibir la adhesión de células U937 a pocillos preincubados con LMN.

La LMN interacciona con multitud de tipos celulares a través de una gran variedad de receptores (Mecham, 1991). Con el fin de analizar una posible implicación fisiológica de estos anticuerpos, se determinó la capacidad de inhibición de la adhesión de células U937. Estas células expresan cadenas $\beta 1$ y $\alpha 6$ (VLA-6) pero no $\alpha 1$ (VLA-1) ó $\alpha 2$ (VLA-2). La unión a LMN no pudo ser inhibida con el anticuerpo monoclonal GoH3 (anti- $\alpha 6$) como ha sido previamente descrito (Kovach *et al.*, 1992), sugiriendo la implicación de otros receptores de LMN en esta interacción (datos no mostrados).

Como se muestra en la Fig. 25a, algunos sueros de pacientes con filariasis fueron capaces de inhibir la adhesión a pocillos de microtitulación. La capacidad de inhibición se asoció significativamente a la presencia de actividad anti-LMN cuando el ensayo se realizó con 100 μ l de suero ($p < 0,0025$, Fig. 25b). No se encontró correlación entre niveles de IgG y porcentaje de inhibición ($r = 0,14$).

PANEL A



PANEL B

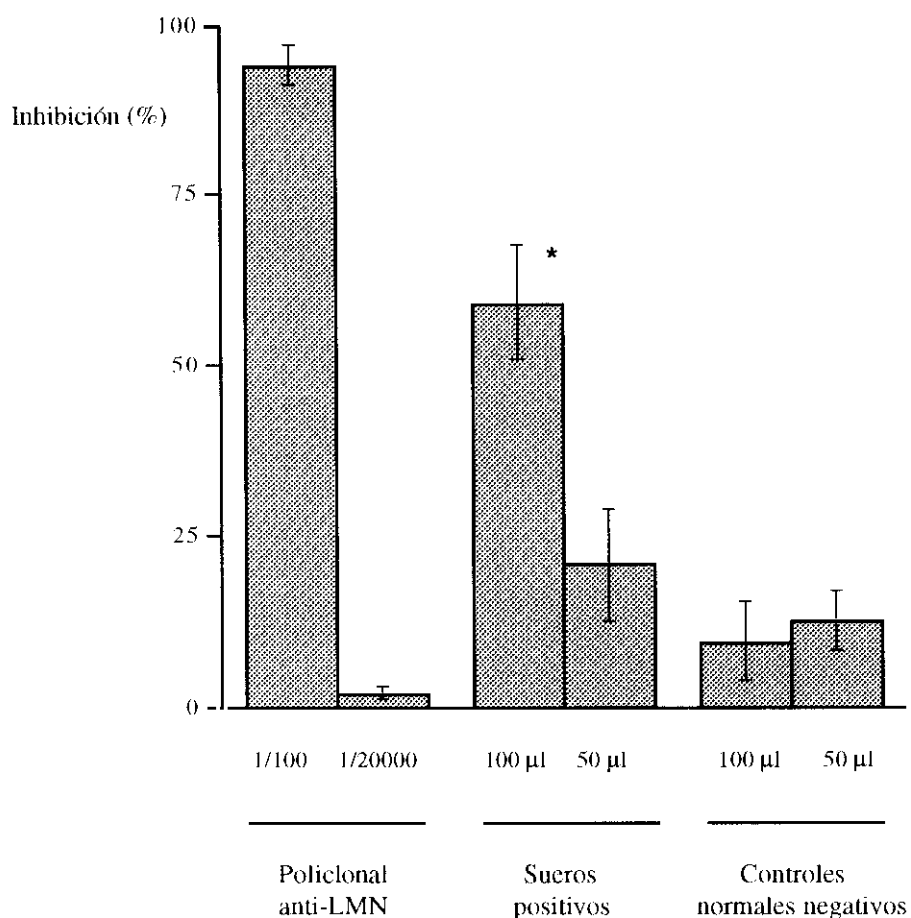


FIGURA 25. Análisis de la capacidad de inhibición de la adhesión de células U937 a LMN.

Panel A: Foto 1: adhesión en ausencia de anticuerpos anti-LMN (PBS-1%BSA). Foto 2: adhesión con 100 µl de un suero negativo. Foto 3: adhesión en presencia de un policlonal anti-LMN (1/100). Fotos 4, 5, y 6: algunos sueros de pacientes con filariasis positivos en ELISA (100 µl) son capaces de inhibir esta adhesión.

Panel B: Porcentaje de inhibición de la adhesión de células U937 con un antisuero policlonal anti-LMN (1/100 y 1/20.000), 100 o 50 µl de suero de pacientes con filariasis positivos en ELISA (n=12), y 100 o 50 µl de sueros controles normales negativos (n=9). * $p < 0,0025$ vs sueros negativos (100 µl). Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media.

DISCUSION

El suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos a partículas ribonucleoprotéicas (RNP) muy conservadas como Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP y ribosomas (Clark *et al.*, 1969; Mattioli & Reichlin, 1974; Tan & Kunkel, 1966; Elkon *et al.*, 1985). La caracterización serológica de esta respuesta es de gran importancia en el diagnóstico. Así, la presencia de autoanticuerpos anti-Sm es específica del LES, y constituye uno de los 11 criterios aceptados para el diagnóstico de esta enfermedad (Tan *et al.*, 1982). La evidencia de que estas partículas RNP participan activamente en procesos de transcripción y síntesis de proteínas hace posible la existencia de proteínas homólogas en otros organismos como protozoos o helmintos (Francoeur *et al.*, 1985b; Mesri *et al.*, 1990; McCauliffe *et al.*, 1990b). De esta manera, un sujeto que sufre una parasitosis podría desarrollar una respuesta inmune dirigida a antígenos del parásito que, por fenómenos de mimetismo molecular, podría implicar el reconocimiento de autoantígenos del hospedador (Levin, 1991; Lux *et al.*, 1992). La identificación de proteínas de protozoos y helmintos con un elevado grado de homología con autoantígenos humanos, es un indicador tanto de un posible origen infeccioso como responsable de la aparición de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes, como de un posible papel patogénico de los autoanticuerpos en las manifestaciones clínicas asociadas a infestaciones por parásitos (Levin, 1991; Meilof *et al.*, 1993).

Además de la presencia de autoanticuerpos anti-RNP, el suero de pacientes con LES contiene anticuerpos dirigidos a antígenos de MEC como colágenos, fibronectina o glucosaminoglucanos (Moreland *et al.*, 1991; Atta *et al.*, 1994a; Faaber *et al.*, 1984). La identificación de proteínas semejantes a estos componentes de MEC en la superficie de parásitos (Selkirk *et al.*, 1989; Bretana *et al.*, 1986), hace posible que en estos pacientes se desarrolle también una respuesta de anticuerpos anti-MEC semejante a la descrita en LES.

En esta Tesis Doctoral se han comparado la respuesta humoral a autoantígenos nucleares y citoplásmicos de naturaleza ribonucleoprotéica (Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP y fosfoproteínas ribosomales) así como de localización extracelular (laminina) en pacientes con LES y pacientes parasitados por protozoos y/o helmintos (Tablas V y VI), con el fin de analizar si la presencia de

parásitos podría inducir una respuesta de autoanticuerpos semejante a la originada en LES. Los parásitos incluidos en el estudio son de localizaciones muy variadas, encontrándose protozoos intestinales (*E. histolytica*, *B. hominis*, *G. lamblia*) y de sangre (*P. falciparum*), nemátodos intestinales (*T. trichiura*, *A. lumbricoides*) y de sangre o tejidos (*M. perstans*, *M. streptocerca*, *O. volvulus* y *L. loa*) y tremátodos extraintestinales (*S. mansoni*).

El análisis de los sueros de una población heterogénea de pacientes parasitados por IFI sobre células Hep-2 (Tabla V), indicó que un gran número de estos reconocían autoantígenos nucleares y citoplásmicos (Fig. 1, paneles G-N). Algunos de los patrones identificados fueron semejantes a los encontrados con controles de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1RNP o ribosomales (Fig. 1; véanse comparativamente los patrones nucleares y/o citoplásmicos de los paneles F-H, B-N, C-L o D-G) y, aunque en la mayoría de los sueros no se pudo relacionar el patrón de IFI con el reconocimiento de éstos, se evaluó la presencia de dichos autoanticuerpos por la posibilidad de que la respuesta policlonal desarrollada en esta población pudiera enmascarar su posible reconocimiento. En este sentido, el estudio comparativo de los patrones de IFI obtenidos con un grupo de sueros controles permitió comprobar que, aunque muchos de ellos poseían especificidades de autoanticuerpos comunes, la existencia de varias de estas especificidades en un mismo suero traía consigo la superposición de patrones haciendo difícil la identificación de los autoantígenos reconocidos (Fig. 1, paneles A-F).

Por tanto, se analizó la presencia de anticuerpos anti-RNP en 30 sueros de la población heterogénea de pacientes parasitados por medio de un ensayo de ELISA con Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP recombinantes, encontrándose que un elevado porcentaje poseía estos autoanticuerpos (Fig. 3), y sugiriendo que la positividad encontrada por IFI podría estar relacionada con su reconocimiento.

Con el fin de evaluar más precisamente estos resultados, se puso a punto una técnica de "Western blot" con extractos de timo de conejo, bazo humano y ribosomas purificados de rata, empleando para ello una población de pacientes con LES que permitiera validar el ensayo. Así, el preparado de timo de conejo permitió analizar la presencia de autoanticuerpos dirigidos a la fosfoproteína La/SSB, los

polipéptidos B⁷/B y D de Sm, y los polipéptidos C y de 70 Kd asociado a la partícula U1 RNP (Fig. 6), el extracto de bazo humano permitió detectar autoanticuerpos frente a los polipéptidos de 60 y 52/54 Kd de Ro/SSA (Fig. 8), y el extracto de ribosomas purificados la presencia de autoanticuerpos anti-P0, P1 y P2 (Fig. 4). En este último caso, aunque el polipéptido P2 sólo se detectó débilmente por los sueros de pacientes con LES, se pudo comprobar que dicho reconocimiento aumentaba cuando las fosfoproteínas se sometían a un tratamiento renaturalizante, lo que indicó además la existencia de epítomos conformacionales en éste polipéptido (Fig. 5). Las frecuencias de autoanticuerpos encontradas por este ensayo correlacionaron con las descritas en la literatura (Tan, 1989) excepto para los autoanticuerpos anti-U1 RNP, lo que permitió además definir un ensayo sensible y fiable.

Los sueros de pacientes con LES estudiados por "Western blot" se analizaron también por la técnica de ELISA empleada para el análisis de esta respuesta en la población de pacientes parasitados, con el fin de comprobar el grado de correlación entre ambos ensayos. La concordancia encontrada en la detección de autoanticuerpos anti-La/SSB fue casi perfecta ($k=0,871$, $p<0,001$; Tabla VII). Sólo se encontró el suero de un paciente con LES positivo en ELISA y negativo en "Western blot". La descripción de determinantes antigénicos conformacionales en La/SSB podría explicar que el suero en cuestión no reconociera este autoantígeno en una técnica muy desnaturalizante como el "Western blot" (McNeilage *et al.* 1992). No obstante, el valor de DO obtenido por ELISA en este suero no fue muy elevado (dato no mostrado), pudiendo deberse esta diferencia a una mayor sensibilidad de este último ensayo en la detección de estos autoanticuerpos.

La concordancia encontrada en la detección de autoanticuerpos anti-Sm fue de nuevo casi perfecta ($k=0,833$, $p<0,001$; Tabla VII). En este caso, los resultados discordantes correspondieron principalmente a sueros positivos por "Western blot" y negativos en ELISA ($n=3$). Esta discrepancia podría deberse a una mayor sensibilidad del "Western blot" basándose en que por este ensayo sí se detectaron éstos autoanticuerpos. La existencia de un suero positivo en ELISA y negativo en "Western blot", pudo deberse a que éste suero reconociese monoespecíficamente los polipéptidos E,

F o G de bajo peso molecular que no se detectaron en el preparado de timo de conejo.

Los resultados obtenidos en la detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA y U1 RNP fueron menos homogéneos que en La/SSB y Sm, encontrándose concordancias dentro del rango moderado ($k=0,474$ para Ro/SSA ($p<0,001$), y $k=0,566$ para U1RNP ($p<0,001$); Tabla VII). En ambos casos, la ausencia de correlación se debió a la existencia de sueros positivos por ELISA pero negativos en el "Western blot". El análisis de esta falta de correlación entre ambas técnicas indicó un sesgo (estadístico de McNemar: 13 y 11, respectivamente) cuyo significado, aunque difícil de definir en ausencia de un "patrón oro", parece deberse a una mayor tendencia del ELISA a proporcionar resultados positivos (Tabla VII).

No obstante, esta ausencia de concordancia pudo ser debida a otras causas que en el caso de Ro/SSA podría ser hubiera sueros que reconociesen preferentemente epítomos conformacionales en este autoantígeno no detectables por "Western blot" (Boire *et al.*, 1991). En U1RNP, la no detección del polipéptido A en el preparado de timo de conejo no parece ser la causante de la aparición de sueros negativos en "Western blot" y positivos en ELISA, ya que en series largas de pacientes con LES no se han identificado sueros que reconozcan mono específicamente este polipéptido (Habets *et al.* 1985). Es más probable que en este último caso el problema radique en la técnica de "Western blot", donde la frecuencia de sueros de pacientes con LES con autoanticuerpos frente a este autoantígeno fue menor que la descrita previamente en la literatura (Tan, 1989). Aunque no se pudo descartar que la preparación de autoantígenos Ro/SSA y U1 RNP empleada en la técnica de ELISA no fuera lo suficientemente pura, la discordancia de resultados podría ser una consecuencia de la policlonalidad de la respuesta anti-RNP en LES, que puede originar el reconocimiento de diferentes determinantes antigénicos en un mismo autoantígeno. Esto puede hacer que diferentes inmunoensayos detecten subpoblaciones de la respuesta total de autoanticuerpos a un mismo autoantígeno, cuya reactividad puede diferir tanto cualitativa como cuantitativamente (Saitta & Keene, 1992), fenómeno similar al observado en la respuesta anti-P con ribosomas desnaturalizados o renaturalizados (Fig. 5). En este sentido, los resultados obtenidos en población normal fueron

aceptables, indicando que los problemas están restringidos a algunos pacientes con LES.

Una vez establecida la utilidad de ambas técnicas en la detección de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y U1 RNP, se analizó por "Western blot" la población de pacientes parasitados en los que previamente se había detectado en ELISA un elevado porcentaje de sueros con autoanticuerpos. Como se muestra en las Figs. 10 y 11, ningún suero reconoció estos autoantígenos aunque la mayoría de ellos presentaron anticuerpos frente a otros polipéptidos en los preparados de timo de conejo y bazo humano. Aunque la movilidad relativa de algunos de los polipéptidos reconocidos fue semejante a la de La/SSB, P0 o B'/B, el posterior estudio por inmunoprecipitación de ARN de extractos marcados de células HeLa no indicó la presencia de dichos autoanticuerpos (Fig. 13). El reconocimiento de antígenos citoplásmicos por IFI en la mayoría de los sueros de pacientes parasitados tampoco se pudo relacionar con la presencia de autoanticuerpos dirigidos a las fosfoproteínas ribosomales P0, P1 y P2 (Fig. 12).

Las explicaciones posibles a estas discrepancias de resultados entre el ELISA y el "Western blot" en la población de pacientes parasitados son varias. La correlación entre niveles de IgG y DO en ELISA fue baja en los cuatro autoantígenos analizados, indicando que éstos niveles no son los principales responsables de la mayor o menor positividad en ELISA. Por otro lado, la posibilidad de que estos autoanticuerpos se detecten exclusivamente en ensayos en los que la desnaturalización de los antígenos sea mínima, fenómeno observado en algunos pacientes con LES (Boire *et al.* 1991, McNeilage *et al.* 1992), no parece ser la causa de estas discordancias, ya que estas partículas RNP no se reconocieron por inmunoprecipitación de ARN, técnica en la que su conformación no se ve alterada. Parece más probable que otros antígenos semejantes o iguales a los que fueron reconocidos por los sueros en "Western blot", pudieran contaminar las preparaciones empleadas en el ELISA.

Por tanto, los resultados parecen indicar que estos sueros no reconocen las partículas RNP reconocidas específicamente por pacientes con enfermedades autoinmunes como el LES, aunque sí reaccionan con otras proteínas propias. Aunque no se pudo comprobar la existencia de proteínas semejantes a Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP o fosfoproteínas P0, P1 y P2 en estos parásitos debido

a la imposibilidad de obtenerlos en cultivo, los estudios previos han permitido atribuirles funciones celulares vitales que hacen posible la presencia de polipéptidos similares en multitud de parásitos (Sharp, 1987; Lerner *et al.*, 1982; Deutscher *et al.*, 1988; Boire & Craft 1990; Keene, 1989; Uchiumi *et al.*, 1990). Así, péptidos homólogos que son reconocidos por el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes, se han identificado en protozoos y nemátodos (Francoeur *et al.*, 1985b; Mesri *et al.*, 1990; McCauliffe *et al.*, 1990b). Aunque en experimentos de inmunización con partículas RNP propias realizados en ratones no se ha conseguido desarrollar la respuesta de autoanticuerpos característica de LES (Hines *et al.*, 1991; Fatenejad *et al.*, 1993), ésta sí se ha conseguido al inmunizar con proteínas extrañas homólogas (Fatenejad *et al.*, 1993; Reuter & Luhrmann, 1986; Hines *et al.*, 1991). No obstante, en algunos casos la especificidad en el reconocimiento del autoantígeno relevante difiere de la encontrada en la enfermedad espontánea (Hines *et al.*, 1991).

Una de las características que relacionan el LES y las enfermedades parasitarias, es la activación policlonal con la consiguiente hipergammaglobulinemia asociada al reconocimiento de antígenos propios. Sin embargo, en LES éstos son muy concretos, aparecen agrupados (partículas de la serie Y (Ro/SSA y La/SSB) ó U (Sm y U1 RNP)), y en algunos casos son muy específicos de esta enfermedad (anti-Sm), indicando que esta activación policlonal no es al azar y que sólo unos cuantos clones se estimulan (Gharavi *et al.*, 1988). El inmunógeno responsable de esta activación se desconoce en la actualidad, aunque se ha postulado que partículas RNP intactas extrañas, o partículas RNP propias junto a polipéptidos extraños puedan actuar como tal (Hines *et al.*, 1991; Fatenejad *et al.*, 1993; Fatenejad *et al.*, 1994).

Por el contrario, los resultados indican que la activación policlonal B que ocurre en pacientes parasitados origina el reconocimiento de una gran variedad de antígenos propios, aunque entre éstos no se incluyen las partículas RNP reconocidas específicamente por pacientes con LES u otras enfermedades autoinmunes relacionadas como el SS o EMTC.

Aunque se han descrito respuestas de autoanticuerpos anti-RNP en infestaciones por parásitos, hay

evidencias que indican diferencias entre ésta y la desarrollada por pacientes con LES. Así, la aparición de autoanticuerpos anti-ribosomales en el suero de pacientes con enfermedad de Chagas, se ha relacionado con cardiomiopatía y concretamente con miocarditis activa (Mesri *et al.*, 1990; Levin, 1991). Sin embargo, en pacientes con LES estos mismos autoanticuerpos se asocian con psicosis lúpica (Bonfa *et al.*, 1987). Algo parecido ocurre con los autoanticuerpos anti-Ro/SSA (calreticulina) detectados en el suero de pacientes parasitados por *O. volvulus*. Aunque en este caso su presencia tampoco se ha correlacionado con la clínica asociada al SS o al lupus cutáneo subagudo (Lux *et al.*, 1992), se han descrito complicaciones reumatológicas en la oncocercosis habiéndose incluso hablado de esta infestación como de un “reumatismo tropical” (Pearson, 1988). No obstante, la relación entre el sistema Ro/SSA-anti-Ro/SSA y la calreticulina está actualmente sujeta a controversia (Rokeach *et al.*, 1991), lo que podría explicar la falta de autoanticuerpos anti-Ro/SSA por “Western blot” e inmunoprecipitación de ARN en los pacientes parasitados por *O. volvulus* incluidos en la población estudiada.

Además del reconocimiento de antígenos nucleares y citoplásmicos por IFI sobre células Hep-2, el estudio de los sueros de pacientes parasitados sobre criocortes de tejido de rata indicó el reconocimiento de estructuras de MEC. Uno de los patrones identificados en un mayor número de sueros fue semejante al reconocimiento de laminina (Foster *et al.*, 1993; Abrahamson *et al.*, 1989), obteniéndose además idéntico patrón con un antisuero policlonal anti-LMN (Fig. 2). De los ocho sueros que presentaron este patrón, siete correspondieron a pacientes parasitados por nemátodos de la Superfamilia Filarioidea por lo que se analizó la presencia de estos anticuerpos en una población de pacientes con filariasis (Tabla VI). Además, se estudió una población de sujetos normales y una población de pacientes con LES en los que, aunque previamente no se han detectado estos anticuerpos, sí se han descrito en modelos murinos de esta enfermedad (Ratkay *et al.*, 1991; Florquin *et al.*, 1991).

El estudio de esta respuesta por ELISA indicó que los anticuerpos anti-LMN de clase IgG se encontraban elevados en pacientes con filariasis y pacientes con LES frente a población normal

($p < 0,0001$ y $p < 0,01$ respectivamente). Utilizando dos desviaciones estándar sobre la media de los valores de DO obtenidos en 30 sueros de población normal como corte para establecer niveles elevados de anticuerpos anti-LMN, 20/30 pacientes con filariasis, 12/87 pacientes con LES, y dos sueros de población normal presentaron estos anticuerpos.

La distribución de subclases de IgG anti-LMN fue diferente (Tabla VIII). Mientras que IgG1 se encontró elevada en todos los grupos, la respuesta IgG2 e IgG3 apareció exclusivamente en pacientes con filariasis. Estas diferencias en el perfil de isotipos de autoanticuerpos dirigidos a un mismo autoantígeno en enfermedades autoinmunes e infecciosas han sido también descritas en la respuesta a proteínas P ribosomales encontrada tanto en pacientes con LES como en la enfermedad de Chagas (Levin, 1991).

El análisis de la capacidad de unión con IgG purificada de una mezcla de sueros de pacientes con LES o filariasis permitió comprobar que ambas curvas de unión eran semejantes ($p < 0,001$, Fig. 16), requiriéndose la misma concentración de LMN para obtener el 50% de inhibición, y sugiriendo que la afinidad media de estos anticuerpos era parecida (Devey *et al.*, 1988). Sin embargo, los sueros de pacientes con LES no reconocieron este antígeno en una técnica desnaturalizante como el "Western blot", mientras que los pacientes con filariasis reconocieron tanto la cadena pesada como la ligera (Fig. 18).

Se evaluó por oxidación de LMN con periodato sódico si una posible respuesta dirigida a polisacáridos de LMN pudiera ser la responsable de las diferencias de reactividad por "Western blot", encontrándose que el reconocimiento de la LMN tratada con periodato era semejante en ambos grupos de pacientes (Fig. 19). Aunque no se pudo concluir exactamente la importancia de la respuesta anti-polisacárido debido a la posible modificación de aminoácidos como consecuencia de este tratamiento (Feizi & Childs, 1987), los resultados sugirieron que la respuesta frente a esta glicoproteína no era exclusivamente una respuesta anti-polisacárido y no explicaron las diferencias observadas por "Western blot". Además, esta respuesta anti-LMN no se pudo inhibir con otra molécula altamente glicosilada como la FN (Fig. 17).

Se analizó por tanto la capacidad de estos anticuerpos de reconocer formas desnaturalizadas de LMN. Por medio de un ensayo de ELISA competitivo, la concentración de LMN nativa o desnaturalizada necesaria para obtener el 50% de inhibición en pacientes con filariasis fue semejante (10 y 15 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, Fig. 20). Sin embargo, en pacientes con LES la LMN tratada con calor pareció ser mejor inhibidor que la LMN nativa, y aparentemente estos resultados parecían estar en contradicción con el “Western blot”. No se pudo explicar esta discrepancia que probablemente esté relacionada bien con los distintos tratamientos desnaturalizantes empleados (hervido o desnaturalizado con SDS/ β -mercaptoetanol), o con las diferencias entre un ensayo de “Western blot” y un ensayo de inhibición en fase líquida, pero estos resultados sugirieron unos requerimientos estructurales distintos en ambos grupos de pacientes para el reconocimiento de LMN. Este punto se confirmó por ensayos de “Western blot” y “Dot-blot”. Por medio de un “Dot-blot”, el reconocimiento de LMN por pacientes con LES pudo ser suprimido con el tratamiento de ésta con SDS y β -mercaptoetanol pero no después de desnaturalizarla por calor (Fig. 21, panel B), mientras que en pacientes con filariasis se reconoció tanto LMN nativa como desnaturalizada (Fig. 21, panel A). Además, una mezcla de sueros de pacientes parasitados reconocieron por “Western blot” tanto LMN desnaturalizada como renaturalizada (Fig. 22, segunda calle de cada panel), mientras que los pacientes con LES sólo lo hicieron después del tratamiento renaturalizante con 3% NP-40 ó Tris-20% glicerol (Fig. 22, tercera calle de cada panel).

Los resultados sugieren que el reconocimiento de LMN en pacientes con LES depende de la conformación de ésta, lo que podría estar relacionado con la falta de reactividad de estos sueros en “Western blot” con LMN desnaturalizada. Observaciones previas han demostrado que la unión a LMN de un anticuerpo monoclonal anti-ADN (H241) con actividad anti-LMN derivado de un modelo murino de lupus, puede ser suprimida con la desnaturalización de LMN con SDS, mientras que un antisero policlonal anti-LMN reconoce también la molécula en la forma desnaturalizada (Sabbage *et al.*, 1989). En este sentido, la reactividad observada por “Western blot” en pacientes parasitados con LMN desnaturalizada o renaturalizada, es similar a la encontrada con el policlonal anti-LMN (Fig. 22,

primera y segunda calle de cada panel).

En los dos sueros normales positivos en ELISA, la reactividad fue demostrada exclusivamente por ésta metodología y débilmente por “Western blot” y “Dot-blot” (Figs. 18 y 21). Aunque los títulos en ELISA fueron similares a los encontrados en pacientes con LES (Fig. 15), la reactividad de los sueros normales con LMN fue distinta. En “Western blot” con LMN desnaturalizada estos anticuerpos se demostraron en los dos sueros normales, si bien uno reconoció cadena pesada y otro ligera (Fig. 18). En la Fig. 22 uno de éstos sueros normales no reconoció LMN desnaturalizada, y esta falta de correlación con los resultados obtenidos en la Fig. 18 podría estar relacionada con el tratamiento reductor de LMN anterior a su aplicación en el gel de poliacrilamida (5 min. a 37° C), que no permitió el reconocimiento de cadenas ligeras de LMN en éste ensayo concreto. En este sentido, una mezcla de sueros de pacientes con filariasis tampoco reconoció cadenas ligeras, detectándose sólo débilmente con el policlonal anti-LMN (Fig 22, primera calle de cada panel). Las diferencias de reactividad de estos anticuerpos en población normal y LES se pusieron de manifiesto al analizar el reconocimiento de formas desnaturalizadas y renaturalizadas. Mientras que en el primer caso sólo se reconoció LMN renaturalizada con 3% NP-40, una mezcla de sueros de LES reconocieron LMN renaturalizada con Tris-20% glicerol ó 3% NP-40 (Fig. 22, tercera y cuarta calle de cada panel). En “Dot-blot” la reactividad de una mezcla de sueros normales positivos difirió también de la encontrada en una mezcla de sueros de pacientes con LES (Fig. 21, paneles B y C).

Así, los anticuerpos anti-LMN detectados en población normal parecen distintos a los encontrados en LES o filariasis. Estudios previos han demostrado la presencia de anticuerpos naturales en población normal dirigidos contra el epítipo Gal α 1-3 Gal presente en LMN EHS (Towbin *et al.*, 1987). Además, se ha descrito la existencia de anticuerpos naturales anti-LMN en suero humano normal (Berneman A. *et al*, 1993), relacionándose estos anticuerpos con cepas bacterianas de la flora intestinal como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* que expresan dichos epítipos Gal α 1-3 Gal (Galili *et al.*, 1984).

El estudio de la actividad anti-LMN de pacientes con filariasis por IFI permitió identificar un patrón

de fluorescencia rodeando células de la musculatura lisa de estómago así como túbulos renales similar al obtenido con el antisuero policlonal anti-LMN (Fig. 23, paneles A y B). Este patrón sólo fue identificado en los sueros con mayores títulos en ELISA, lo que probablemente fue debido a las diferencias de sensibilidad entre ambos ensayos. La reactividad anti-LMN fue también detectada débilmente con IgG purificada de un suero normal positivo en ELISA, pero no de una mezcla de sueros normales negativos (Fig. 23, paneles D y E). Aunque en pacientes con LES se pudo detectar débilmente este patrón en la membrana basal de los túbulos renales, no se pudo identificar una reactividad similar sobre musculatura lisa de estómago, a pesar de que algunos de estos sueros presentaron títulos en ELISA similares a pacientes con filariasis que sí reconocieron LMN en este substrato (Fig. 23, panel C). Una posible explicación a esta discrepancia podría ser que en los pacientes con LES, los anticuerpos anti-LMN estuviesen reaccionando cruzadamente con otros autoantígenos presentes en las secciones.

Estudios previos han demostrado que los autoanticuerpos anti-ADN, los principales marcadores serológicos en pacientes con LES, reaccionan cruzadamente con componentes de MEC (Faaber *et al.*, 1984). Algunos anticuerpos anti-ADN son capaces de formar depósitos inmunes por unión a estructuras distintas de ADN presentes en localizaciones extracelulares dentro del glomérulo (Madaio *et al.*, 1987). En este sentido, se ha demostrado que un anticuerpo monoclonal anti-ADN derivado de un modelo murino de LES, es capaz de reaccionar cruzadamente con LMN (Sabbage *et al.*, 1989). En la enfermedad crónica injerto frente a hospedador (GVHD), un modelo empleado para el estudio de la respuesta autoinmune que caracteriza el LES humano (Gelpí *et al.*, 1986), la presencia de autoanticuerpos anti-LMN de subclase IgG1 se piensa que juega un papel importante en la inmunopatología renal, habiéndose incluso detectado estos anticuerpos en eluídos del glomérulo (Florquin *et al.*, 1991). Como se observa en la Fig. 24, los niveles de anticuerpos anti-LMN en LES correlacionan significativamente con los niveles de anticuerpos anti-ADN de hélice sencilla ($r=0,801$; $p<0,025$). Es de destacar que la frecuencia de aparición de anticuerpos anti-ADN de hélice sencilla en LES es más elevada que la frecuencia de anticuerpos anti-LMN descrita aquí, lo que parece indicar

que sólo una subpoblación de pacientes con LES y anticuerpos anti-ADN serían capaces de reaccionar cruzadamente con LMN. En este sentido, se ha sugerido que los autoanticuerpos anti-ADN que se unen al riñón en pacientes con lupus, podrían constituir una subpoblación de autoanticuerpos anti-ADN de baja afinidad caracterizada por la capacidad de reconocer ciertos constituyentes del glomérulo como glucosaminglucanos (Isenberg & Shoenfeld, 1987; Naparstek & Plotz, 1993). La correlación encontrada entre los niveles de ambos anticuerpos, sugiere que esta glicoproteína puede estar también implicada en la unión de anticuerpos anti-ADN al glomérulo. No obstante, si los anticuerpos anti-LMN detectados en pacientes con LES reaccionan cruzadamente con ADN de doble hélice y/o están implicados en el daño glomerular se desconoce en la actualidad.

Por el contrario, los niveles de anticuerpos anti-ADN detectados en pacientes con filariasis fueron muy bajos (Fig. 24), no encontrándose correlación significativa entre éstos y los anticuerpos anti-LMN ($r=0,273$; $p>0,1$, n.s.). Aunque se ha descrito la existencia de anticuerpos anti-ADN en el suero de pacientes parasitados por filarias (Thomas *et al.*, 1989), su presencia no se ha asociado con el idiotipo 16/6, un idiotipo público relacionado estrechamente con los autoanticuerpos anti-ADN de doble hélice en LES, y que aparece también en infestaciones crónicas por helmintos (Thomas *et al.*, 1989).

En algunas enfermedades parasitarias como la Leishmaniasis cutánea americana o la enfermedad de Chagas, la presencia de anticuerpos anti-LMN en suero se ha explicado por la existencia de moléculas semejantes a ésta en la superficie de los parásitos (Bretana *et al.*, 1986). Sin embargo, estudios recientes sugieren que estas moléculas no existen en la superficie de filarias, postulándose que el mimetismo molecular no sea el causante de la aparición de estos anticuerpos (Petalanda & Piessens, 1994). Aunque en estos trabajos no se pudo excluir con certeza la presencia de dichas moléculas semejantes a LMN, se sugirió que proteasas derivadas del parásito pudieran degradar la LMN permitiendo así la exposición de epítomos nuevos susceptibles de ser reconocidos por el suero, implicando además directamente a este mecanismo en la dermatitis producida por *O. volvulus* (Petalanda & Piessens, 1994).

Las funciones atribuidas a la LMN son múltiples e incluyen adhesión, migración, crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares (Sasaki *et al.*, 1988; Aumailley *et al.*, 1987; Graft *et al.*, 1987; Kuboata *et al.*, 1992). Además, la molécula completa o fragmentos de ésta, puede actuar como factor quimiotáctico de mastocitos, proporcionando un mecanismo por el cual éstas células pueden ser atraídas a sitios de daño tisular (Thompson *et al.*, 1989). Esta actividad podría ser especialmente relevante en las respuestas de los tejidos del hospedador a la inflamación que acompaña infestaciones por parásitos, encontrándose además que un anticuerpo policlonal anti-LMN es capaz de inhibir esta quimiotaxis (Thompson *et al.*, 1989). Por otra parte, estudios previos han demostrado que los anticuerpos anti-LMN pueden regular el tráfico de linfocitos (Weglinsky-Kupiec & De Sousa, 1991). La demostración de que la LMN no está confinada exclusivamente a las membranas basales, sino que además forma parte de la matriz del estroma, apoya la posibilidad de que componentes de la MEC puedan regular el tráfico de linfocitos a través del endotelio así como dentro de distintos microentornos dentro del tejido linfoide (De Sousa *et al.*, 1991). Estos mecanismos indicarían una participación activa de la LMN en la regulación de la respuesta inmune en multitud de situaciones.

Con el fin de analizar una posible implicación fisiológica de esta actividad anti-LMN, se determinó la capacidad de inhibir la adhesión de la línea celular U937 a pocillos de microtitulación preincubados con LMN. Como se muestra en la Fig 25, la presencia de estos anticuerpos en suero correlaciona significativamente con la capacidad de inhibir la adhesión de esta línea celular ($p < 0,0025$), lo que podría estar directamente relacionado con un posible papel fisiológico de estos anticuerpos. Así, se podría especular que la aparición de estos anticuerpos en suero podría ser un mecanismo regulador desarrollado por parásitos con el fin de evitar la respuesta inmune del hospedador. Sin embargo, sólo con grandes volúmenes de suero se pudo inhibir esta adhesión por lo que no se puede asegurar la importancia funcional *in vivo*. En este sentido, se requieren estudios más profundos con anticuerpos anti-LMN purificados de suero, así como con líneas celulares que expresen un único receptor con el fin de evaluar más precisamente estos resultados, así como de determinar los receptores implicados en esta inhibición. Desafortunadamente, no se pudo estudiar esta capacidad de inhibición en sueros

de pacientes con LES debido al alto volumen de suero requerido para el ensayo.

Cualquiera que sea el significado de estos anticuerpos, los resultados indican que el reconocimiento de LMN es diferente en LES y filariasis, y apoyan el concepto de que los anticuerpos producidos por inmunización con moléculas similares presentes en parásitos, poseen especificidades distintas de los producidos espontáneamente en enfermedades autoinmunes como el LES. Estas diferencias de reactividad frente a LMN podrían estar relacionadas con un posible papel patogénico (¿LES?) o protector/regulador (¿filariasis?) de anticuerpos dirigidos frente a un mismo antígeno en dos grupos de pacientes.

Hay descripciones en la literatura en las que se reflejan fenómenos similares a éste. Así, los autoanticuerpos anti-M2 encontrados frecuentemente en el suero de pacientes con cirrosis biliar primaria y que reconocen mitocondrias tanto de mamíferos como de bacterias (Stemerowicz *et al.*, 1988), son capaces de inhibir el complejo piruvato deshidrogenasa de mamífero, inhiben moderadamente el de levadura, pero sólo débilmente el de *E. coli* (Teoh *et al.*, 1994). Sin embargo, los anticuerpos anti-M2 detectados en el suero de pacientes con *Mycobacterium tuberculosis*, no son capaces de inhibir la actividad piruvato deshidrogenasa de ninguna fuente y reconocen mejor por "Western blot" el autoantígeno de bacterias que el de levadura o humano (Klein *et al.*, 1993). Esto indica que una infección crónica con un microorganismo que contenga el autoantígeno relevante, puede originar una respuesta al autoantígeno del microorganismo pero no al del hospedador.

Los anticuerpos anti-ribosomales relacionados con psicosis lúpica en LES humano, se han encontrado en el suero de pacientes parasitados por *T. cruzi*, aunque en este caso se han asociado a cardiomiopatía y concretamente a miocarditis activa (Mesri *et al.*, 1990; Levin, 1991). La persistencia de estos autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas se ha explicado por la existencia de un alto grado de homología con autoantígenos del hospedador, basándose en la capacidad de reaccionar cruzadamente con fosfoproteínas P humanas y en la expresión de éstas en la superficie celular (Koren *et al.*, 1992). Esta reactividad cruzada también se ha descrito en los autoanticuerpos detectados en pacientes con LES (Skeiky *et al.*, 1993). Sin embargo, la distribución de subclases de IgG en la

respuesta anti-P en LES y enfermedad de Chagas difiere, siendo en el primer caso IgG1 y IgG2, mientras que en infestaciones por *T. cruzi* es exclusivamente IgG1 (Levin, 1991). En este sentido, se ha demostrado que los anticuerpos anti-P inducidos por inmunización de ratones con ribosomas extraños, poseen especificidades distintas que los producidos espontáneamente (Hines *et al.*, 1991).

En ambos casos, al igual que en los anticuerpos anti-LMN descritos anteriormente, el reconocimiento de una misma molécula difiere entre pacientes con enfermedades autoinmunes e infecciosas. Esto indicaría que aunque en una infección se pueda originar una respuesta dirigida a autoantígenos reconocidos por el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes, se requiere algo más que reactividades cruzadas para el desencadenamiento de una respuesta autoinmune, y por consiguiente, de la clínica asociada a ésta.

CONCLUSIONES

1-. El suero de una población heterogénea de pacientes parasitados (protozoos y/o helmintos), posee anticuerpos que reconocen antígenos de localización nuclear y citoplásmica por inmunofluorescencia indirecta. Aunque por ELISA un alto porcentaje posee autoanticuerpos anti-RNP, estos resultados son falsamente positivos basándose en que estos sueros no reconocen Ro/SSA, La/SSB, Sm, U1 RNP o fosfoproteínas ribosomales por “Western blot” e inmunoprecipitación de ARN. Estos resultados apoyan el concepto de especificidad entre la presencia de autoanticuerpos anti-RNP y enfermedades autoinmunes, indicando que una activación policlonal indiscriminada no origina autoanticuerpos dirigidos a estos autoantígenos cuyo reconocimiento es característico de pacientes con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES).

2-. La técnica de “Western blot” con extractos de timo de conejo, bazo humano y ribosomas purificados, permite valorar la respuesta de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm y fosfoproteínas ribosomales P0, P1 y P2 en pacientes con LES, definiéndose un ensayo sensible y específico que permite detectar porcentajes de positividad conformes a los descritos en la literatura. La correlación de resultados entre este ensayo y una técnica de ELISA con autoantígenos recombinantes es casi perfecta para La/SSB ($k=0,871$, $p<0,001$) y Sm ($k=0,833$, $p<0,001$), y moderada para Ro/SSA ($k=0,474$, $p<0,001$) y U1 RNP ($k=0,566$, $p<0,001$). El análisis de la ausencia de correlación en la detección de anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-U1 RNP indicó una predisposición en las medidas (McNemar=13 y 11 respectivamente) cuyo significado, aunque difícil de determinar en ausencia de un “patrón oro”, parece deberse a una mayor tendencia del ELISA a proporcionar resultados positivos.

3-. Se ha demostrado por primera vez la existencia de anticuerpos anti-laminina (matriz extracelular) en pacientes con filariasis (66,7%) y en LES (13,8%), detectándose también esta actividad en un bajo porcentaje de sueros de población normal (6,6%).

4-. El estudio comparativo de la actividad anti-LMN detectada en filariasis, LES y población normal permite concluir que:

4.1-. En LES y población normal la respuesta de IgG anti-LMN está restringida a la subclase IgG1, mientras que en filariasis también es IgG2 e IgG3.

4.2-. Los anticuerpos anti-LMN de pacientes con filariasis reconocen en "Western blot" esta glicoproteína tanto en forma nativa como desnaturalizada, mientras que los pacientes con LES sólo reconocen LMN después de someterla a tratamientos renaturalizantes.

4.3-. Los anticuerpos anti-LMN detectados en LES y en población normal difieren en la capacidad de reconocer LMN sometida a distintos tratamientos renaturalizantes o desnaturalizantes.

4.4-. La actividad anti-LMN de pacientes con LES correlaciona significativamente con la actividad anti-ADN de hélice sencilla ($r=0,801$, $p<0,025$).

4.5-. La actividad anti-LMN detectada en filariasis se correlaciona con la capacidad de inhibición de la adhesión de células U937 a pocillos de microtitulación preincubados con esta glicoproteína ($p<0,0025$).

5-. Las diferencias en el reconocimiento de ésta glicoproteína observadas en pacientes con LES o filariasis apoyan la hipótesis de que los autoanticuerpos producidos por inmunización con autoantígenos o moléculas similares presentes en parásitos poseen especificidades distintas a los producidos espontáneamente en individuos con enfermedades autoinmunes como el LES.

BIBLIOGRAFIA

Abrahamson D.R., Irwin M.H., St. John P.L., Perry E.W., Accavitti M.A., Heck L.W., Couchman J.R. Selective immunoreactivities of kidney basement membranes to monoclonal antibodies against laminin: localization of the end of the long arm and the short arms to discrete microdomains. *J Cell Biol* 1989; **109**: 3477-3491.

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

Arroyo A.G., Sanchez-Mateos P., Campanero M.R., Martin-Padura I., Dejana E., Sanchez-Madrid F. Regulation of the VLA integrin ligand interaction through the $\beta 1$ subunit. *J Cell Biol* 1992; **117**: 659-670.

Atta M.S., Powell R.J., Hopkinson N.D., Todd I. Human anti-fibronectin antibodies in systemic lupus erythematosus: occurrence and antigenic specificity. *Clin Exp Immunol* 1994a; **96**: 20-25.

Atta M.S., Powel R.J., Todd I. The influence of anti-fibronectin antibodies on interactions involving extracellular matrix components and cells: a possible pathogenic mechanism. *Clin Exp Immunol* 1994b; **96**: 26-30.

Aumailley M., Nurcombe V., Edgar D., Paulsson M., Timpl R. The cellular interactions of laminin fragments. *J Biol Chem* 1987; **262**: 11532-11538.

Avila J.L., Rojas M., Towbin H. Serological activity against galactosyl ($\alpha 1-3$)-galactose in sera from patients with several kinetoplasic infections. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 126-132.

Baboonian C., Venables P.J.W., Booth J., Williams D.G., Roffe L.M., Maini R.N. Virus

infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La (SSB): a possible mechanism for autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 1989; **78**: 454-459.

Beck K., Hunter I., Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 1990; **4**: 148-160.

Ben-Chetrit E., Fox R.I., Tan E.M. Dissociation of immune responses to the SSA/Ro 52 Kd and 60 Kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1990; **33**: 349-355.

Berneman A., Guilbert B., Eschrich S., Avrameas S. IgG auto- and polyreactivities of normal human sera. *Mol Immunol* 1993; **30**: 1499-1510.

Boire G., Craft J. Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. *J Clin Invest* 1989; **84**: 270-279.

Boire G., Craft J. Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J Clin Invest* 1990; **85**: 1182-1190.

Boire G., López Longo F.J., Lapointe S., Ménard H.A. Sera from patients with autoimmune diseases recognize conformational determinants of the 60 Kd Ro/SSA protein. *Arthritis Rheum* 1991; **34**: 722-730.

Bonfa E., Golombek S.J., Kaufman L.D, Skelly S., Weissbach H., Brot N., Elkon K.B. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *New Engl J Med* 1987; **317**: 265-271.

Botazzo G.F., Todd I., Mirakian R., Belfiore A., Pujol-Borell R. Organ-specific autoimmunity: A 1986 Overview. *Immunol Rev* 1986; **94**: 137-169.

Bretana A., Avila J.H., Arias-Flores M., Contreras M., Tapia F.J. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*: immunocytochemical localization of a laminin-like protein in the plasma membrane. *Exp Parasitol* 1986; **61**: 168-175.

Busch H., Reddy R., Rothblum L., Choi Y.C. SnRNAs, snRNPs, and RNA processing. *Ann Rev Biochem* 1982; **51**: 617-654.

Calés M., Salinas M., Fando, J.L. Isolation of eukaryotic initiation factor II from rat brain. *J Neurochem* 1985; **45**: 1298-1302.

Canonge R.S. Fibronectina y diabetes mellitus. *Endocrinología* 1992; **39**: 60-70.

Chan E.K.L., Francoeur A.M., Tan E.M. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SSB/La nuclear protein. *J Immunol* 1986; **136**: 3744-3749.

Chan E.K.L., Sullivan K.F., Fox R.I., Tan E.M. Sjögren's syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes. *J Autoimmun* 1989; **2**: 321-327.

Chan E.K.L., Hamel J.C., Buyon J.P., Tan E.M. Molecular definition and sequence motifs of the 52 Kd component of human Ro/SSA autoantigen. *J Clin Invest* 1991; **87**: 68-76.

Clark G., Reichlin M., Thomas T.B. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1969; **102**: 117-122.

Clément B., Sequi-Real B., Savagner P., Kleinman H.K., Yamada Y. Hepatocyte attachment to laminin is mediated through multiple receptors. *J Cell Biol* 1990; **110**: 185-192.

Conner G.E., Nelson D., Wisniewolsky R., Lahita R.G., Blobel G., Kunkel H.G. Protein antigens of the RNA-protein complexes detected by anti-Sm and anti-RNP antibodies found in serum of patients with systemic lupus erythematosus and related disorders. *J Exp Med* 1982; **156**: 1475-1485.

Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. *Rheumatic Dis Clin North Am* 1992; **18**: 311-335.

Darnell J., Lodish H., Baltimore D. *Biología celular y molecular*. Barcelona: Omega, 1993; 973-1023.

Dejana E., Colella S., Languino L.R., Balconi G., Corbascio G.C., Marchisio P.C. Fibrinogen induces adhesion, spreading and microfilament organization of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1987; **104**: 1403-1411.

Derksen R.H., Van Dam A.P., Gmelig Meyling F.H., Bijlsma J.W., Smeeenk R.J. A prospective study on antiribosomal P proteins in two cases of familial lupus and recurrent psychosis. *Ann Rheum Dis* 1990; **49**: 779-782.

De Sousa M., Tilney N.L., Weglinsky-Kupiec J.W. Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. *Immunol Today* 1991; **12**: 262-266.

Deutscher S.L., Harley J.B., Keene J.D. Molecular analysis of the 60 Kd human Ro

ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9479-9483.

Devey M.E., Bleasdale K., Lee S., Rath S. Determination of the functional affinity of IgG1 and IgG4 antibodies to tetanus toxoid by isotype-specific solid-phase assays. *J Immunol Methods* 1988; **106**: 119-125.

Dunn S.D. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Ann Biochem* 1986; **157**: 144-153.

Elkon K.B., Parnassa A.P., Foster C.L. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med* 1985; **162**: 459-471.

Elkon K.B., Skelly S., Parnassa A., Moller W., Danho W., Weissbach H., Brot N., Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7419-7423.

Faaber P., Capel P.J.A., Rijke G.P.M., Vierwinden G., Van de Putte L.B.A., Koene A.P., Cross-reactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans. *Clin Exp Immunol* 1984; **55**: 502-508.

Facer C.A., Agiostratidou G. High levels of anti-phospholipid antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *Clin Exp Immunol* 1994; **95**: 304-309.

Fatenejad S., Mamula M.J., Craft J. Role of intermolecular/intrastructural B- and T-cell determinants in the diversification of autoantibodies to ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 12010-12014.

Fatenejad S., Brooks W., Schwartz A., Craft J. Pattern of anti-small nuclear ribonucleoprotein antibodies in MRL/Mp-lpr/lpr mice suggest that the intact U1 snRNP particle is their autoimmunogenic target. *J Immunol* 1994; **152**: 5523-5531.

Feizi T., Childs R.A. Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem J* 1987; **245**: 1-11.

Feldman M.D., Huston D.P., Karsh J., Balow J.E., Klima E., Steinberg A.D. Correlation of serum IgG, IgM, and anti-native-DNA antibodies with renal and clinical indexes of activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1982; **9**: 52-58.

Ferrell P.B., Tan E.M. Systemic lupus erythematosus. En: Rose N.R., MacKay I.R., ed. *The autoimmune diseases*. Florida: Academic Press, 1985; 30-54.

Florquin S., Abramowicz D., Heer E., Bruijn J.A., Doutrelepon J.M., Goldman M., Hoedemaecker P. Renal immunopathology in murine host-versus-graft disease. *Kidney I* 1991; **40**: 852-861.

Foster M.H., Sabbaga J., Line S.R., Thompson K.S., Barrett K.J., Madaio M.P. Molecular analysis of spontaneous nephrotropic anti-laminin antibodies in an autoimmune MRL-lpr/lpr mouse. *J Immunol* 1993; **151**: 814-824.

Francoeur A.M., Chan E.K.L., Garrels J.I., Mathews M.B. Characterization and purification of lupus antigen La, an RNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1985a; **5**: 586-590.

Francoeur A.M., Gritzmacher C.A., Peebles C.L., Recse R.T., Tan E.M. Synthesis of small

nuclear ribonucleoprotein particles by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985b; **82**: 3635-3639.

Fritzler M.J., Salazar M. Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev* 1991; **4**: 256-269.

Gabrielli A., Montroni M., Rupoli S., Caniglia M.L., DeLustro F., Danieli G. A retrospective study of antibodies against basement membrane antigens (type IV collagen and laminin) in patients with primary and secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 1988; **31**: 1432-1436.

Gabrielli P., Candela M., Ricciatti A.M., Caniglia M. L., Wieslander J. Antibodies to mouse laminin in patients with systemic sclerosis (scleroderma) recognize galactosyl (α 1-3) galactose epitopes. *Clin Exp Immunol* 1991; **86**: 367-373.

Galili U., Rachmilewitz E., Peleg A., Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J Exp Med* 1984; **160**: 1519-1531.

Gelpí C., Rodríguez-Sánchez J.L., Brunet C., Martínez M.A., Craft J., Juárez C., Hardin J.A. Antinuclear antibodies (ANAs) produced by mice with graft versus host (GVH) disease identify the same autoantigenic epitopes recognized by human SLE sera. *Arthritis Rheum* 1986, **29** (Suppl.4): S71.

Gharavi A.E., Chu J., Elkon K.B. Autoantibodies to intracellular proteins in human systemic lupus erythematosus are not due to random polyclonal B cell activation. *Arthritis Rheum* 1988; **31**: 1337-1345.

Graf J., Iwamoto Y., Sasaki M., Martin G., Kleinman H.K., Robey F.A., Yamada Y. Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis and receptor binding. *Cell* 1987; **48**: 989-996.

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

Habets W.J., Berden H.M., Hoch S.O., Van Venrooij W.J. Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 ribonucleoprotein antigens. *Eur J Immunol* 1985; **15**: 992-997.

Habets W.J., Hoet M.H., Van Venrooij W.J. Epitope patterns of anti-RNP antibodies in rheumatic diseases. Evidence for an antigen-driven autoimmune response. *Arthritis Rheum* 1990; **33**: 834-841.

Hardgrave K.L., Neas B., Scofield R.H., Harley J.B. Antibodies to vesicular stomatitis virus proteins in patients with systemic lupus erythematosus and in normal subjects. *Arthritis Rheum* 1993; **36**: 967-970.

Harrison's. *Principles of internal medicine*. 12th Ed. New York: McGraw-Hill, 1991.

Henney S.C. Structural and conformational specificity of the antigen for RF. *Ann NY Acad Sci* 1969; **168**: 52.

Hines J.J., Weissbach H., Brot N., Elkon K. Anti-P autoantibody production requires P1/P2 as immunogens but is not driven by exogenous self-antigen in MRL mice. *J Immunol* 1991; **146**: 3386-

3395.

Horsfall A.C. Molecular mimicry and autoantigens in connective tissue diseases. *Mol Biol Rep* 1992; **16**: 139-147.

Isenberg D., Shoenfeld Y. The origin and significance of anti-DNA antibodies. *Immunol Today* 1987; **8**: 279-282.

Keene J.D. Molecular structure of the La and Ro autoantigens and their use in autoimmune diagnostics. *J Autoimmun* 1989; **2**: 329-334.

Keyser F., Hoch S., Takei M., Dang H., Keiser H., Rokcach L.A., Talal N. Cross-reactivity of the B⁷B subunit of the Sm ribonucleoprotein autoantigen with proline-rich polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; **62**: 285-290.

Klein R., Wiebel M., Engelhart S., Berg P.A. Sera from patients with tuberculosis recognise the M2a-epitope (E2-subunit of pyruvate dehydrogenase) specific for primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1993; **92**: 308-316.

Koren E., Reichlin M.W., Koscec M., Fugate R.D., Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1236-1241.

Kovach N.L., Carlos T.M., Yee E., Harlan J.M. A monoclonal antibody to β 1 integrin (CD29) stimulates VLA-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *J Cell Biol* 1992; **116**: 499-509.

Kuboata S., Tashiro K., Yamada Y. Signaling site of laminin with mitogenic activity. *J Biol Chem* 1992; **267**: 4285-4288.

Kurata N., Tan E.M. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmuno-electrophoresis. *Arthritis Rheum* 1976; **19**: 574-580.

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

Landis J.R., Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; **33**: 159-174.

Languino L.R., Gehlsen K.R., Wayner E., Carter W.G., Engvall E., Ruoslahti E. Endothelial cells use $\alpha 2\beta 1$ as a laminin receptor. *J Cell Biol* 1989; **109**: 2455-2462.

Le Page S.H., Dudeny C., Shall S., Shoenfeld Y., Isenberg D.S. Disease specificity of antibodies to poly (ADP-ribose); their relationships to anti-DNA antibodies and to disease activity in lupus. *Autoimmunity* 1990; **5**: 169-177.

Lerner E.A., Lerner M.R., Hardin J.A., Janeway C.A., Steitz J.A. Deciphering the mysteries of RNA-containing lupus antigens. *Arthritis Rheum* 1982; **25**: 761-766.

Lerner M.R., Steitz J.A. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with SLE. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 5495-5499.

Levin M.J. Molecular mimicry and Chagas' heart disease: high anti-R-13 autoantibody levels are

markers of severe Chagas heart complaint. *Res Immunol* 1991; **142**: 157-159.

Love P.E., Santoro S.A. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and non-SLE related disorders. *Ann Intern Med* 1990; **112**: 682-698.

Lux F.A., McCauliffe D.P., Buttner D.W., Lucius R., Capra D., Sontheimer R.D., Lieu T. Serological cross-reactivity between a human Ro/SSA autoantigen (calreticulin) and the λ RAL-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1945-1951.

Madaio M.P., Carlson J., Cataldo J., Ucci A., Migliorini P., Pankewycz O. Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form immune deposits. *J Immunol* 1987; **138**: 2883-2889.

Maizels R.M., Blaxter M.L., Roberston B.D., Selkirk M.E. Carbohydrates. En *Parasite, antigens parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991; 87-96.

Mathews M.B., Francoeur A.M. La antigen recognizes and binds to the 3' oligouridylate tail of a small RNA. *Mol Cell Biol* 1984; **4**: 1134-1140.

Mattioli M., Reichlin M. Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. *J Immunol* 1971; **107**: 1281-1290.

Mattioli M., Reichlin M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum*

1974; **17**: 421-429.

McCauliffe D.P., Lux F.A., Lieu T.S., Sanz I., Hanke J., Newkirk M.N., *et al.* Molecular cloning, expression and chromosome 19 localization of a human Ro/SSA autoantigen. *J Clin Invest* 1990a; **85**: 1379-1391.

McCauliffe D.P., Zappi E., Lieu T.S., Michalak M., Sontheimer R.D., Capra J.D. A human Ro/SSA autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with Onchocercal RAL-1 antigen and an Aplysia "memory molecule". *J Clin Invest* 1990b; **86**: 332-335.

McNeilage L.J., Umapathysivam K., McMillan E., Guidolin A., Whittingham S., Gordon T.P. Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the La/SSB ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1652-1656.

Mecham R. P. Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEB J* 1991; **5**: 2538-2546.

Meilof J.F., Van der Lelij A., Rokeach L.A., Hoch S.O., Smeenk R.T.J. Autoimmunity and filariasis. *J Immunol* 1993; **151**: 5800-5809.

Mesri E.A., Levitus G., Hontebeyrie-Joskowicz M., Dighiero G., Van Regenmortel M. H. V., Levin M.J. Major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1219-1224.

Monestier M., Kotzin B.L. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus syndromes. *Rheumatic Dis Clin North Am* 1992; **18**: 415-435.

- Moreland L.W., Gay R.E., Gay S. Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and SLE. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; **60**: 412-418.
- Ohsone Y., Mimori T., Griffith A., Akizuki M., Homma M., Craft J. Hardin J.A., Molecular cloning of cDNA encoding Sm autoantigen: derivation of a cDNA for a B polypeptide of the U series of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4249-4253.
- Oldstone M.B. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987; **50**: 819-820.
- Oldstone M.B. Molecular mimicry as mechanism for the cause and as a probe uncovering etiologic agent(s) of autoimmune diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989; **145**: 130-135.
- Pearson C.A. A major cause of third world rheumatism largely overlooked-onchocerciasis. *Brit J Rheumatol* 1988; **27**: 414.
- Petit C., Sauron M.E., Gilbert M., Thèze J. Use of immunoblotting to detect idiotypic determinants on monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 1989; **178**: 144-149.
- Petralanda I., Piessens W.F. Pathogenesis of onchocercal dermatitis: possible role of parasite proteases and autoantibodies to extracellular matrix proteins. *Exp Parasitol* 1994; **79**: 177-186.
- Pisetsky D.S. Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatic Dis Clin North Am* 1992; **18**: 437-453.
- Query C.C., Bentley R.C., Keene J.D. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70 K U1 snRNP protein. *Cell* 1989; **57**: 89-101.

Rader M.D., O'Brien C., Liu Y., Harley J.B., Reichlin M. Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1293-1298.

Ratkay L.G., Tonzetich J., Waterfield J.D. Antibodies to extracellular matrix proteins in the sera of MRL-lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; **59**: 236-245.

Rauh A.J., Horning H., Luhrmann R. At least three distinct B cell epitopes reside in the C-terminal half of La protein as determined by a recombinant DNA approach. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 2049-2057.

Reuter R., Luhrmann R. Immunization of mice with purified U1 small nuclear ribonucleoprotein (RNP) induces a pattern of antibody specificities characteristic of the anti-Sm and anti-RNP autoimmune response of patients with lupus erythematosus, as measured by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 8689-8693.

Rokeach L.A., Haselby J.A., Hoch S.O. Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4832-4836.

Rokcach L.A., Jannatipour M., Haselby J.A., Hoch S.O. Primary structure of a human small nuclear ribonucleoprotein polypeptide as deduced by cDNA analysis. *J Biol Chem* 1989; **264**: 5024-5030.

Rokeach L.A., Haselby J.A., Meilof J.F., Smeenk R.J.T., Unnasch T.R., Greene B.M. Hoch S.O. Characterization of the autoantigen calreticulin. *J Immunol* 1991; **147**: 3031-3039.

Routsias J.G., Sakarellos M., Detsikas E., Tzioufas A.G., Sakarellos G., Moutsopoulos H.M.

Antibodies to EYRKK vesicular stomatitis virus-related peptide account only for a minority of anti-Ro 60 Kd antibodies. *Clin Exp Immunol* 1994; **98**: 414-418.

Sabbaga J., Peres Line S.R., Potocnjak P., Madaio M.P. A murine nephritogenic monoclonal anti-DNA autoantibody binds directly to mouse laminin, the major non-collagenous protein component of the glomerular basement membrane. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 137-143.

Saitta M.R., Keene J.D. Molecular biology of nuclear autoantigens. *Rheumatic Dis Clin North Am* 1992; **18**: 283-309.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sasaki M., Kleinman H.K., Huber H., Deutzmann R., Yamada Y. Laminin, a multidomain protein. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16536-16544.

Selkirk M.E., Nielsen L., Kelly C., Partono F., Sayers G., Maizels R.M. Identification, synthesis and immunogenicity of cuticular collagens from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; **32**: 229-246.

Sharp P.A. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 1987; **235**: 766-771.

Shimizu Y., Van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (β 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 1990; **345**: 250-253.

Shoenfeld Y., Cohen E.R. Infection and Autoimmunity. En Sela M, ed. *The antigens*. Vol 3. New

York: Academic Press, 1987; 307-325.

Sillekens P.T., Habets W.J., Beijer R.P., Venrooij W.J. cDNA cloning of the human U1 snRNA-associated A protein: extensive homology between U1 and U2 snRNP specific proteins. *EMBO J* 1987; **6**: 3841-3848.

Skeiky Y.A.W., Benson D.R., Guderian J.A., Sleath P.R., Parsons M., Reed S.G. *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P protein gene family. *J Immunol* 1993; **151**: 5504-5515.

StClair E.W., Pisetsky D.S., Reich C.F., Keene J.D. Analysis of autoantibody binding to different regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1988; **141**: 4173-4180.

Stefano J.E. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 1984; **36**: 145-154.

Stemerowicz R., Moller B., Rodloff A., Freudenberg M., Hopf U., Wittenbrink C., *et al.* Are antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis induced by R (rough)-mutants of enterobacteriaceae?. *Lancet* 1988; **2**: 1160-1170.

Tan E.M., Kunkel H.G. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1966; **96**: 464-471.

Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F., Masi A.T., McShane D.J., Rothfield N.F., Schaller J.G., Talal N., Winchester R.J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; **25**: 1271-1277.

Tan E.M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; **44**: 93-141.

Teoh L., K., MacKay I.R., Rowley M.J., Fussey P.M. Enzyme inhibitory autoantibodies to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis differ for mammalian, yeast and bacterial enzymes: implications for molecular mimicry. *Hepatology* 1994; **19**: 1029-1033.

Thomas M.A.B., Frampton G., Isenberg D.A., Shoenfeld Y., Akinsola A., Ramzy M., Lilleywhite J., Williams D.G. A common anti-DNA antibody idiootype and anti-phospholipid antibodies in sera from patients with schistosomiasis and filariasis with and without nephritis. *J Autoimm* 1989; **2**: 803-811.

Thompson H.L., Burbelo P.D., Yamada Y., Kleinman H.K., Metcalfe D. Mast cells chemotaxis to laminin with enhancement after IgE-mediated activation. *J Immunol* 1989; **143**: 4188-4192.

Timpl R., Paulsson M., Dziadek M., Fujiwara S. Basement membranes. *Methods Enzymol* 1987; **145**: 363-391.

Towbin H., Rosenfeld G., Wieslander J., Avila J.L., Rojas M., Szarfman A., Esser K., Nowack H., Timpl R. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, american cutaneous leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl (α 1-3)-galactose epitopes. *J Exp Med* 1987; **166**: 419-432.

Towbin J., Staehelin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 4350-4354.

Tsokos G.C., Pillemer S.R., Klippel J.H. Rheumatic disease syndromes associated with antibodies to the Ro(SSA) ribonuclear protein. *Semin Arthritis Rheum* 1987; **16**: 237-244.

Uchiumi T., Traut R.R., Kominami R. Monoclonal antibodies against acidic phosphoproteins P0, P1, and P2 of eukaryotic ribosomes as functional probes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 89-95.

Unnasch T.R., Gallin M.Y., Soboslay P.T., Erttmann K.D., Greene B.M. Isolation and characterization of expression cDNA clones encoding antigens of *Onchocerca volvulus* infective larvae. *J Clin Invest* 1988; **82**: 262-269.

Van Dam A.P., Van den Brink H.G., Smeenk J.T. Technical problems concerning the use of immunoblots for the detection of antinuclear antibodies. *J Immunol Methods* 1990; **129**: 63-70.

Weglinsky-Kupiec J.W., De Sousa M. Lymphocyte traffic is modified in vivo by anti-laminin antibody. *Immunol* 1991; **72**: 312-313.

Whittingham S., Naselli G., McNeilage L.J. Autoepitopes reactive with anti-SSB/La. *J Autoimmun* 1989; **2**: 345-351.

Yamagata H., Harley J.B., Reichlin M. Molecular properties of the SSA/Ro antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. *J Clin Invest* 1984; **74**: 625-633.

Yamamoto K., Miura H., Moroi Y., *et al.* Isolation and characterization of a complementary DNA expressing human U1 small nuclear ribonucleoprotein C polypeptide. *J Immunol* 1988; **140**: 311-317.

ANEXO

El trabajo desarrollado en esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- 1-. García Lerma J.G., Sequí Navarro J., Vela Olmo C. Características moleculares de los autoantígenos SSA/Ro, SSB/La y snRNP (Sm y U1 RNP). *Inmunología* 1994; **13**: 85-101.

- 2-. García Lerma J.G., Zea Mendoza A.C., Ramos M.J., Sequí Navarro J. Evaluation of recombinant Ro/SSA, La/SSB, Sm and U1 RNP autoantigens in clinical diagnosis. *J Clin Lab Anal* 1995; **9**: 52-58.

- 3-. García Lerma J.G., Moneo I., Ortiz de Landázuri M., Sequí Navarro J. Comparison of the anti-laminin antibody response in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and parasitic diseases (filariasis). *Clin Immunol Immunopathol* 1995; **75**: (pendiente de las páginas, se adjuntan pruebas de imprenta).

Características moleculares de los autoantígenos SSA/Ro, SSB/La y snRNP (Sm y U1 RNP)

J.G. García Lerma, J. Sequi Navarro y C. Vela Olmo*

Sección de Inmunología, Centro Nacional de Investigación Clínica, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

*Inmunología y Genética Aplicada, S.A.

El suero de pacientes con enfermedades autoinmunes se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos frente a una gran variedad de antígenos propios. La naturaleza y localización de éstos es muy variada; pueden ser desde receptores celulares, hormonas, plaquetas, inmunoglobulinas y proteínas del plasma, hasta componentes de la matriz extracelular, citoplasma y núcleo.

Entre la gran variedad de autoanticuerpos descritos se encuentran los que reconocen partículas ribonucleoproteicas altamente conservadas como SSA/Ro, SSB/La y snRNP.

Estos anticuerpos han permitido la identificación de homologías estructurales y de secuencia con proteínas no relacionadas, así como la localización de secuencias RNP consenso, motivos *helix-turn-helix* (HTH), *zinc-binding finger* y *leucine zipper* que se han relacionado con la propiedad que poseen estos autoantígenos de unir ARN. Debido a que estos motivos se encuentran altamente conservados, se ha postulado que el sistema inmune pueda responder a antígenos similares presentes en un amplio número de organismos, de manera que reactividades cruzadas puedan ser responsables del desencadenamiento de los fenómenos autoinmunes. Aunque se ha encontrado poca reactividad de autoanticuerpos frente a estos motivos, se sugiere que puedan servir como epitopos para las células T. La obtención de estos autoantígenos por tecnología de ADN recombinante ha permitido además el montaje de técnicas de diagnóstico aplicado a estas enfermedades. Debido a que normalmente estos autoantígenos se encuentran representados en bajas cantidades y sus procesos de purificación son costosos y laboriosos, la posibilidad de obtenerlos con la máxima pureza y en cantidades suficientes supone un gran paso en el desarrollo de técnicas de detección. Con la aplicación de tecnologías basadas en el clonaje, se buscan procesos en los que éstos dejen de ser una limitación. Para el desarrollo de estos procedimientos de diagnóstico, ha sido necesario previamente un análisis profundo de los epitopos diana identificándose determinantes antigénicos tanto lineales como conformacionales.

Palabras clave: Autoantígeno SSA/Ro, SSB/La y snRNP. Clonaje. Autoanticuerpos.

Molecular characteristics of autoantigens SSA/Ro, SSB/La and snRNP (Sm and U1 RNP)

Sera from patients with autoimmune diseases are characterized by the pre-

sence of autoantibodies directed against a wide variety of self-antigens. The nature and location of these autoantigens is extremely varied as they can be cellular receptors, platelets, hormones, immunoglobulins, plasma proteins as well as extracellular matrix, cytoplasmic and nuclear compounds.

The presence of autoantibodies directed against highly conserved ribonucleoprotein particles such as SSA/Ro, SSB/La and snRNP has led to the study of their molecular characteristics, which has enabled the identification of structural and sequential homologies with nonrelated proteins together with *helix-turn-helix*, *zinc-binding finger* and *leucine zipper* motifs related to the RNA-binding capacity of these autoantigens. Since these motifs are highly conserved, it is possible that the immune system could respond to similar antigens from a wide variety of organisms. Although there appears to be little autoantibody reactivity to the motif structures themselves, it has been suggested that they serve as T-cell epitopes. Because of these autoantigens are usually represented in human tissues in low concentrations and the purification processes are very complex, its important the development of techniques that allow us to obtain them in large quantities and suitable for the production of serological tests. Bacterially produced recombinant human autoantigens have facilitated the development of sensitive ELISA suitable for the routine screening of large series of sera. For the development of diagnostic procedures with recombinant autoantigens, it has been necessary to study the epitopes recognized. This has allowed the identification of linear and conformational epitopes in some of them.

Key words: SSA/Ro, SSB/La and snRNP autoantigens. Cloning. Autoantibodies.

INTRODUCCIÓN

El suero de pacientes con enfermedades autoinmunes se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos frente a una gran variedad de antígenos propios¹. La naturaleza y localización de éstos es muy variada; pueden ser desde receptores celulares, hormonas, plaquetas, inmunoglobulinas y proteínas del plasma, hasta componentes de la matriz extracelular, citoplasma y núcleo²⁻⁷.

Excepto en casos muy concretos, se sabe poco acerca del papel que

Correspondencia y solicitud de separatas: Dr. J.G. García Lerma. Sección de Inmunología, Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva, Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado, 10. 28029 Madrid.

desempeñan los autoanticuerpos en los procesos clínicos de estas situaciones patológicas, por lo que muchos autores tienden a considerarlos como un epifenómeno. Sin embargo, hay asociaciones claras entre ciertas especificidades de autoanticuerpos y situaciones autoinmunes concretas⁸. Así, la presencia de anticuerpos dirigidos frente al antígeno Sm de Smith es uno de los criterios aceptados por el American College of Rheumatology para el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico (LES)⁹, mientras que los dirigidos hacia otro antígeno nuclear, la partícula U1 RNP, aunque no específicamente, aparecen con elevada frecuencia en el suero de pacientes con enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), un cuadro caracterizado por la combinación de síndromes clínicos presentes en varias enfermedades autoinmunes¹⁰.

Entre la gran variedad de autoanticuerpos se encuentran los que reconocen partículas ribonucleoproteicas altamente conservadas como SSA/Ro, SSB/La y snRNP. Su estrecha asociación con situaciones autoinmunes concretas ha llevado al estudio profundo de su naturaleza molecular y a la caracterización en cuanto a secuencia.

Esto ha permitido la identificación de homologías estructurales y de secuencia con proteínas no relacionadas, así como la localización de secuencias RNP consenso, motivos *helix-turn-helix* (HTH), *zinc-binding finger* y *leucine zipper*, que se han relacionado con la propiedad que poseen estos autoantígenos de unir ARN⁷.

Debido a que estos motivos se encuentran altamente conservados, se ha postulado que el sistema inmune pueda responder a antígenos similares presentes en un amplio número de organismos, de manera que reactividades cruzadas puedan ser responsables del desencadenamiento de los fenómenos autoinmunes. Aunque se ha encontrado poca reactividad de autoanticuerpos frente a estos motivos, se sugiere que puedan servir como epitopos para las células T⁷.

La obtención de estos autoantígenos por tecnología de ADN recom-

binante ha permitido además el montaje de técnicas de diagnóstico aplicado a estas enfermedades¹¹. Debido a que normalmente estos autoantígenos se encuentran representados en bajas cantidades y sus procesos de purificación son costosos y laboriosos, la posibilidad de obtenerlos con la máxima pureza y en cantidades suficientes supone un gran paso en el desarrollo de técnicas de detección. Con la aplicación de tecnologías basadas en el clonaje, se buscan procesos en los que éstos dejen de ser una limitación. Para el desarrollo de estos procedimientos de diagnóstico, ha sido necesario previamente un análisis profundo de los epitopos diana identificándose determinantes antigénicos tanto lineales como conformacionales¹².

ANTICUERPOS ANTI-SSA/Ro

En el año 1969, Clark et al¹³ describieron por vez primera el antígeno Ro. Utilizando una técnica de contraelectroforesis (CIE), encontraron que el suero de un paciente con LES y factor antinuclear negativo contenía anticuerpos reactivos con un extracto citoplásmico de células de bazo humano obtenido de autopsia.

En un principio se pensó que este antígeno, identificado en hígado, riñón, bazo, pulmón y tejido linfático, era un componente soluble del citoplasma, esperándose por tanto que por inmunofluorescencia indirecta (IFI) se localizase en esta fracción. Sin embargo, estos estudios no aportaron fluorescencia citoplásmica, por lo que llegó a la conclusión de que sus resultados eran debidos a problemas de inaccesibilidad del antígeno, a sus bajas concentraciones y a su alta solubilidad que provocaría su pérdida durante los lavados¹⁴.

Estudios independientes en los que se emplearon sueros de pacientes con síndrome de Sjögren (SS) mostraron la existencia de anticuerpos que precipitaban tres antígenos diferentes de un extracto de cultivo de linfocitos humanos. Los anticuerpos fueron designados como precipitinas A, B, y C con el prefijo SS

indicando síndrome de Sjögren. Así, se observó que pacientes con SS primario contenían precipitinas SSA y SSB, mientras que los que padecían artritis reumatoide y SS contenían SSC¹⁵. Usando una técnica de inmunodifusión doble, Alspaugh y Maddison demostraron que Ro y SSA eran el mismo antígeno¹⁶.

Los anticuerpos dirigidos frente a SSA/Ro se han encontrado en el 0,44% de controles de mujeres sanas, 30-40% de pacientes con LES y 70-80% de pacientes con SS¹⁴. Su presencia también se ha asociado a varios síndromes clínicos como el lupus-factor antinuclear negativo, lupus cutáneo subagudo y lupus neonatal^{17,18}.

Estos autoanticuerpos reconocen partículas ribonucleoproteicas pequeñas poco abundantes (aproximadamente 150.000 copias/célula)¹⁹, y cuyo componente proteico ha sido descrito como polipéptido con un peso molecular que varía entre 50 y 150 kD. Aunque algunos autores han recogido más del 90% de estas partículas en la fracción citoplásmica de células HeLa²⁰, la localización celular de este autoantígeno aún está sujeta a controversia (tabla I).

Estudios realizados por diversos grupos han llevado a la conclusión de que el principal componente del sistema Ro-anti-Ro es un polipéptido ácido de 60 kD que se asocia a pequeños ARN de 83-112 nucleótidos²¹. Además de esta proteína de 60 kD común en muchos tipos celulares, el análisis de lisados crudos de linfocitos y eritrocitos ha permitido identificar una proteína adicional de 52 kD (linfocitos) y otra de 54 kD (eritrocitos) (tabla I). Aunque en ambos tipos celulares se encuentra el polipéptido Ro de 60 kD, parece ser que son dos formas antigénicamente distintas, encontrándose sueros que son capaces de reconocer una y no la otra²².

Ben-Chetrit et al²³ analizaron la respuesta anti-Ro en dos series amplias de pacientes con SS y LES, encontrando que un 47% de los sueros de ambas enfermedades reaccionaban frente a los dos polipéptidos simultáneamente, mientras que la reactividad exclusiva hacia el polipéptido de 52 kD se limitaba a los

TABLA I. Localización, características moleculares y función biológica de los autoantígenos SSA/Ro, SSB/La, Sm y U1 RNP

Autoantígeno	Localización	Características moleculares	Función biológica
SSA/Ro	¿Citoplasma?	Partículas ribonucleoproteicas compuestas por polipéptidos de 60, 52 (linfocitos) y 54 kD (eritrocitos) asociados a hY1, hY3, hY4 y hY5 RNA ¿Calreticulina (60 kD)?	¿Metabolismo de ARN de forma transcripcional? ¿Control de la distribución de ARNm hacia formas traslacionalmente activas o inactivas?
SSB/La	Nuclear	Polipéptido de 48 kD asociado a transcritos recién sintetizados por la ARN polimerasa III (EBER 1 y 2, 5S ARN, Y5 ARN, 4.5S ARN)	Factor de transcripción de la RNA pol. III. Actúa a nivel de terminación y liberación de transcritos
Sm	Nuclear	Polipéptidos B' (29), B (28), D (16), E (12), F (11) y G (9 kD) asociados a ARN de la serie U (alto contenido en uracilo)	Procesamiento de transcritos recién sintetizados de RNA. Eliminación de intrones y religamiento de exones
U1 RNP	Nuclear	Polipéptidos A (33), C (22) y de 70 kD asociados a U1 ARN	Procesamiento de transcritos recién sintetizados de RNA. Eliminación de intrones y religamiento de exones

pacientes con SS y la dirigida sólo a la forma de 60 kD se daba en pacientes con LES. Esta disociación de la respuesta inmune hacia distintas proteínas de SSA/Ro sugiere que puede haber diferencias en los procesos autoinmunes de estas dos situaciones patológicas^{24,25}. La aparición de sueros con actividad anti-SSA/Ro que reconocen el antígeno de 60 kD en contraelectroforesis (CIE) pero no en Western immunoblot (WB), ha definido otra subpoblación de sueros que reconoce epitopos altamente conformacionales²⁶. De los tres sujetos con estas características, en dos se comprobó que habían desarrollado lupus cutáneo subagudo seguido de LES.

El número de ARN asociados a estas proteínas difiere entre células de mamífero. Mientras que en humanos hay cuatro ARN denominados hY1, hY3, hY4 y hY5 (*h* corresponde a humanos; hY2 es una forma ligeramente degradada de hY1) (tabla I), en ratón estas proteínas sólo se asocian a mY1 y mY2 (*m* corresponde a murino). Wolin et al¹⁹ han descrito una homología de secuencia significativa de mY1 y mY2 con hY1 y hY3 de células HeLa pero ninguna con hY5, así como que la unión del polipéptido Ro de 60 kD a estos ARN ocurre en los apareamientos que se dan en los extremos 5' y 3'. Al ser estos ARN productos

de la ARN polimerasa III se han encontrado, al menos transitoriamente, asociados al polipéptido SSB/La (fig. 1).

Boire et al caracterizaron en células HeLa tres subpoblaciones de partículas ribonucleoproteicas intactas con propiedades fisicoquímicas distintas²⁹. Una de ellas contenía hY5 RNA (partícula Ro hY5), otra hY4 (Ro hY4) y una tercera hY1, hY2 y hY4 (Ro hY1-Y4). En la purificación de estas tres partículas se encontró que la presencia simultánea de la proteína Ro de 60 kD y de la fosfoproteína SSB/La se daba exclusivamente en Ro hY5. Es de destacar que autoanticuerpos dirigidos frente a SSA/Ro y SSB/La a menudo se dan simultáneamente. La estrecha proximidad, así como la asociación estable de estos polipéptidos en las partículas Ro hY5, proporcionan una macromolécula diana que apoya la hipótesis de que los autoantígenos dirigen la respuesta de las enfermedades autoinmunes.

La descripción en el suero de 2 pacientes de anticuerpos que reconocen un epitopo restringido a las partículas Ro intactas que contienen el polipéptido de 60 kD unido a hY5 RNA (Ro hY5) indicó una especificidad estructural, sugiriendo además que ribonucleoproteínas nativas podrían servir como inmunógeno además del polipéptido Ro ais-

lado¹⁹. Además, se encontró que anticuerpos específicos de Ro hY5 no inmunoprecipitaban ninguna partícula Ro de líneas celulares no humanas sugiriéndose que, en contraste con otros autoanticuerpos encontrados en LES y otras enfermedades relacionadas, los anticuerpos anti-Ro hY5 reconocen epitopos no conservados en autoantígenos que sí lo están.

Se sabe muy poco acerca de las funciones de SSA/Ro en la célula (tabla I). Deutscher et al²⁷, al analizar la secuencia de aminoácidos deducida a partir de un clon de ADNc que codificaba para la proteína de 60 kD, demostraron la existencia de un motivo *zinc-binding finger* formado por la secuencia C-X3-C-X10-H-X2-H en las posiciones 305 a 323, y que es característico de proteínas que unen ADN, aunque también se ha descrito en proteínas que unen ARN. Este motivo proteico se piensa que interviene positivamente en la unión de proteínas a ácidos nucleicos, encontrándose una correlación directa entre la unión de los factores de transcripción TFIIIA de *Xenopus Laevi* y SP1 a ADN, y la presencia de cinc²⁷.

Otra característica encontrada al analizar la secuencia fue la existencia del octámero RNP consenso característico de proteínas que unen ARN como los polipéptidos de 70

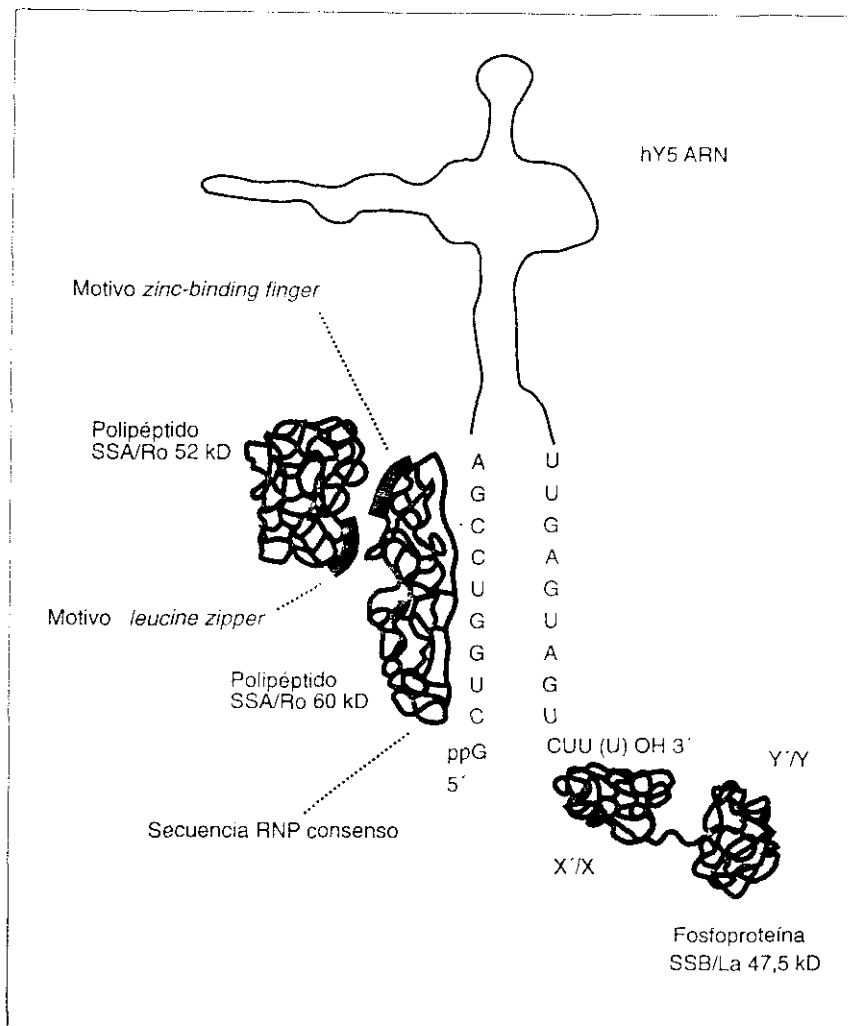


Fig. 1. Modelo de participación de SSA/Ro y SSB/La en las partículas ribonucleoproteicas. El polipéptido SSA/Ro de 60 kD interaccionaría con el ARN a través de la secuencia RNP consenso, y con SSA/Ro-52 kD por el motivo zinc-binding finger²⁷. A su vez, SSA/Ro-52 kD lo haría con el polipéptido de 60 kD a través del motivo leucine zipper²⁵. SSB/La interacciona con el extremo 3' OH de hY5 ARN⁴⁰.

kD y A asociados a U1 RNP, y la fosfoproteína SSB/La²⁸.

Se ha sugerido que el motivo *zinc-binding finger* y la secuencia RNP consenso pueden cooperar en el reconocimiento de ARN. Muchas de las proteínas que poseen el primero desempeñan un papel importante en la transcripción, mientras que aquellas que poseen la secuencia RNP consenso están implicadas en el procesamiento de ARN. La proteína SSA/Ro posee ambas características.

Otros autores han postulado que los motivos *zinc-binding finger*

pueden estar más implicados en la interacción proteína-proteína que en la interacción proteína-ácido nucleico. Según esta interpretación, la proteína Ro de 60 kD puede unir hY ARN a partir de su secuencia RNP consenso, y puede interaccionar con otras proteínas como la proteína Ro de 52 kD a través del motivo *zinc-binding finger* (fig. 1)²⁷.

Esto, junto a la evidencia de que la proteína SSB/La puede estar en la misma partícula ribonucleoproteica, parecen indicar que las funciones de SSA/Ro en el metabolismo del ARN se dan de forma transcripcional^{20,27}.

Otros autores postulan que SSA/Ro puede tener un papel importante en el control de la distribución de ARNm hacia formas traslacionalmente activas o inactivas. Bachmann et al identifican SSA/Ro y SSB/La como componentes del complejo ribonucleoproteico endorribonucleasa VII²⁰.

Análisis molecular de la ribonucleoproteína SSA/Ro

Los primeros datos sobre la estructura primaria de la proteína SSA/Ro humana fueron aportados por el grupo de Lieu et al cuando se secuenció la región aminoterminal del polipéptido de 60 kD humano³⁰. La obtención de un péptido que comprendía los residuos 6 a 19 y que fue inmunorreactivo con sueros con actividad anti-SSA/Ro, indicó la existencia de un epítipo en la región aminoterminal de la molécula.

En 1988, Deutscher et al²⁷ aislaron por vez primera un clon de ADNc de la proteína SSA/Ro de 60 kD analizando su secuencia completa.

Este clon se vio que codificaba para un polipéptido de 538 aminoácidos con una movilidad relativa aparente de 60.649 kD. La secuencia de aminoácidos predicha mostró la existencia de una gran región de alfa-hélice situada en la mitad central de la molécula, estructura similar a la descrita en el antígeno SSB/La cuya especificidad a menudo se asocia con la aparición de anticuerpos anti-Ro en sueros autoinmunes^{12,31}. Sin embargo, no se observó ninguna homología de secuencia significativa entre ambas proteínas.

Otras características encontradas fueron la identificación de un motivo *zinc binding finger* en posiciones 305 a 323, así como el octámero RNP consenso formado por los aminoácidos Lys/Arg-Gly-Phe-Gly/Ala-Phe-Val-X-Phe/Tyr y que ya había sido previamente identificado en A y la proteína de 70 kD asociada a U1 RNP (tabla II)²⁸.

Casi simultáneamente a estos trabajos, Ben-Chetrit et al caracterizaron otro clon de ADNc de la proteína SSA/Ro humana que codificaba para un polipéptido de 57.5 kD²⁹. La secuencia aportada por

este grupo fue muy semejante a la descrita por Deutscher et al²⁷.

En ninguna de las secuencias publicadas por estos 2 grupos se identificó el péptido de 16 aminoácidos sintetizado por Lieu et al³⁰ y descrito como muy inmunorreactivo, por lo que se postuló que este grupo aisló un componente adicional al sistema ribonucleoproteico³¹.

En 1990, el grupo de McCauliffe et al³² describió una secuencia del antígeno Ro humano de 60 kD (calreticulina) que no mostraba ninguna homología con las descritas previamente^{27,29,31}. El hallazgo de que anticuerpos específicos frente a la secuencia codificada por su ADNc reaccionaran tanto con el Ro de 52 como con el de 60 kD llevó a este grupo a pensar en la existencia de un epitopo compartido entre ambas moléculas. Estudios de localización cromosómica situaron al gen de esta proteína en el brazo corto del cromosoma 19, región donde también reside la proteína de 70 kD asociada a U1 RNP. La relación entre este antígeno y el sistema Ro-anti-Ro no está clara.

En la secuencia no se identificó el octámero RNP consenso característico de proteínas que unen ARN, encontrándose sin embargo una configuración *helix-turn-helix* entre los residuos 207 a 255 que se postula puede ser un sitio de unión a ARN (tabla II).

Al comparar su secuencia con la de otras proteínas se observó una homología del 63% con un antígeno del nematodo *Onchocerca volvulus* (tabla III), sugiriéndose la posibilidad de que una proteína extraña homóloga a una propia puede ser responsable del desencadenamiento de una respuesta autoinmune³³. Lux et al³⁴ han demostrado la existencia de anticuerpos que reaccionan con la calreticulina en sujetos parasitados por este nematodo y que, sin embargo, no manifiestan clínica autoinmune, apoyando la idea de que se requiere algo más que una reactividad cruzada para el desencadenamiento de un fenómeno autoinmune.

La descripción previa de una proteína de 52 kD que formaba parte de la partícula ribonucleoproteica

TABLA II. Motivos proteicos identificados en los autoantígenos SSA/Ro, SSB/La, Sm y U1 RNP

Autoantígeno	Motivos proteicos
SSA/Ro 60 kD	Octámero RNP consenso, motivo <i>zinc binding finger</i>
Calreticulina (¿SSA/Ro?)	Motivo <i>helix-turn-helix</i>
SSA/Ro 52 kD	Motivo <i>zinc-binding finger</i> , motivo <i>leucine zipper</i>
SSB/La	Octámero RNP consenso
Polipéptidos A y de 70 kD de U1 RNP, B'' de U2 RNP	Octámero RNP consenso
Polipéptidos B, B', A y C de snRNP	Motivo PP/aPGMR/iPP

TABLA III. Autoantígenos y homologías encontradas con otras proteínas

Autoantígeno	Homologías	Referencia bibliográfica
Calreticulina (¿SSA/Ro?)	Antígeno del nematodo <i>Onchocerca volvulus</i> (63%)	32,33
SSA/Ro 52 kD	Proteína <i>rff</i> humana (50%)	25
SSB/La	Homología estructural con la proteína de unión a ADN de adenovirus, polipéptido gag de retrovirus felino	39, 56
Polipéptido D de snRNP	Región conservada de las <i>protaminas</i> , antígeno nuclear de Epstein-Barr EBNA-1	73
Polipéptido E de snRNP	Proteína ribosomal <i>var1</i> de levadura	74

SSA/Ro^{22,35}, y que reaccionaba específicamente con un grupo de pacientes con SS, no haciéndolo con sueros de LES²³, llevaron al grupo de Chan et al a analizar las características moleculares de este antígeno²⁵.

A partir de una biblioteca de ADNc de células Molt-4, identificaron un clon que codificaba para el polipéptido de 52 kD completo. Entre las características estructurales encontradas al analizar la secuencia, se observó un motivo *leucine zipper* (residuos 211 a 232), un dominio en la mitad carboxiloterminial con elevada homología con la proteína humana *rff* (tabla III) y, al igual que en la proteína SSA/Ro de 60 kD, una secuencia *zinc binding finger* (tabla II).

Inicialmente, los motivos *leucine zipper* fueron descritos en proteínas que unen ADN (DBP). Actualmente, se sabe que estos motivos participan en la interacción proteína-proteína importante para la unión a ADN³⁶. La existencia de este motivo proteico se ha postulado que

puede ser importante para la interacción de SSA/Ro con otras proteínas²⁵.

Aunque se comprobó la existencia de un alto grado de homología de Ro-52 kD con la proteína *rff* humana (mayor del 50%), no se encontró reactividad cruzada de autoanticuerpos anti-SSA/Ro con ella, apoyando la idea de que los autoanticuerpos humanos son altamente específicos con sus dianas antigénicas, y que la posibilidad de aparición de fenómenos autoinmunes por reactividades cruzadas es muy limitada.

Al compararse la secuencia publicada por este grupo con las descritas anteriormente para el antígeno Ro de 60 kD^{27,29,32} no se observó ningún grado de homología.

Utilización de antígeno SSA/Ro recombinante en el diagnóstico

Debido a las dificultades encontradas en la purificación de este antígeno de fuentes naturales donde

además se encuentra en bajas cantidades, la posibilidad de obtención de proteína SSA/Ro recombinante es una herramienta útil para la detección de estos autoanticuerpos.

En todos los experimentos de clonaje de este autoantígeno, se describe el empleo de controles consistentes en sueros de individuos sanos y sueros de pacientes que presentan esta y otras especificidades autoinmunes. En los estudios de Deutscher et al²⁷, tanto sueros con actividad anti-Ro procedentes de los CDC (Center for Diseases Control, Atlanta) como controles comerciales, reaccionan con la proteína SSA/Ro recombinante, mientras que individuos sanos y sueros con otras especificidades autoinmunes como SSB/La, U1 RNP y Sm no lo hacen. Estos resultados pueden generalizarse a todos los grupos que han obtenido esta proteína de forma recombinante^{25,27,29,32}.

James et al³⁷ realizaron un análisis comparativo por WB sobre la antigenicidad del polipéptido SSA/Ro de 60 kD obtenido como proteína de fusión a betagalactosidasa, y el purificado de fuentes naturales. Para ello, estudiaron la reactividad frente a ambas en 5 sujetos sanos, y en 27 pacientes que padecían enfermedades reumáticas en los que se había confirmado previamente la existencia de anticuerpos anti-Ro por inmunodifusión doble (ID).

Los resultados obtenidos por WB fueron que de los 27 sueros con actividad anti-Ro vista por ID, 20 reaccionaban con ambas proteínas, tres no reaccionaban con ninguna, dos lo hacían con la recombinante pero no con la humana, y otros dos lo hacían con la humana pero no con la recombinante. Los controles negativos no lo hicieron con ninguna.

Aunque la correlación observada en el reconocimiento de ambos sistemas antigénicos no fue mala, la falta de concordancia obtenida con algunos sueros se explicó por: a) una ausencia de reactividad hacia la proteína recombinante originada por la desaparición de epítomos dependientes de las modificaciones postraduccionales características de células eucariotas; b) el reconocimiento de epítomos adicionales

creados por la fusión a betagalactosidasa, y c) la destrucción de epítomos altamente conformacionales debido al tratamiento desnaturante llevado a cabo en el WB.

ANTICUERPOS ANTI-SSB/La

A comienzos de la década de los años setenta Mattioli y Reichlin³⁸ prepararon a partir de timo de ternera un extracto nuclear y otro citoplásmico, detectando en este último la presencia de un antígeno sensible al calentamiento moderado y que, debido a su sensibilidad a ARNs y tripsina, lo definieron como constituido por ARN y proteína. A este antígeno que precipitaba con el suero de un paciente que padecía LES lo denominaron La, iniciales del primer apellido del citado paciente.

En un principio, y debido a que estudios con inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre cortes de hígado de ratón proporcionaban una ligera fluorescencia nuclear, mientras que sobre timocitos de ternera era muy intensa y localizada en el citoplasma, se pensó que este antígeno se localizaba en el citoplasma.

Poco después, se encontró que el suero de pacientes con SS contenía anticuerpos que reaccionaban con extractos solubles de una línea celular linfocítica designando el antígeno como SSB³⁵. Este antígeno tenía origen nuclear, por lo que se pensó que era distinto del La descrito con anterioridad. Sin embargo, posteriormente se comprobó que SSB y La eran el mismo antígeno, y que las observaciones que localizaban el La en el citoplasma eran debidas a su alta solubilidad en salino fisiológico, de forma que durante los procesos de fraccionamiento subcelular podía ser fácilmente extraíble del núcleo apareciendo por tanto en la fracción citoplásmica¹⁶.

Los anticuerpos anti-SSB/La se detectan casi exclusivamente en pacientes con SS y LES. La frecuencia de aparición varía según los autores y técnicas, oscilando entre un 40 y un 70% en SS primario y entre un 10 y un 15% en LES¹. El origen y papel patogénico de este autoanticuerpo se desconoce.

Este antígeno es una fosfoproteína altamente conservada con al menos 8 isoformas cuyo punto isoelectrónico varía entre 6 y 7 y que se han relacionado con el grado de fosforilación³⁹. Se estima que hay aproximadamente 10⁶ copias por célula de mamífero⁴⁰.

Hay distintos polipéptidos descritos como SSB/La y que probablemente reflejan distintos productos de degradación de la proteína nativa. Por WB, y en ausencia de proteasas añadidas exógenamente, el polipéptido de 46-48 kD es el predominante, observándose la presencia de polipéptidos menores cuyo número y tamaño varía según la especie de origen. El peso molecular de la rofeína sin degradar oscila entre 45 y 50 kD dependiendo de su origen⁴¹.

Esta fosfoproteína está constituida por dos dominios resistentes a la digestión con diferentes proteasas. Chan et al⁴¹ sometieron a la proteína aislada de distintas fuentes a digestiones proteolíticas controladas, encontrando un dominio X/X' de 28/29 kD resistente a la acción de tripsina, quimotripsina, elastasa, proteinasa K y proteasa V8 de *S. aureus*, y un dominio Y/Y' de 23/24 kD detectado después de la digestión parcial con tripsina y proteasa V8 (fig. 2).

A partir de estudios en los que se utilizaron células HeLa cultivadas en presencia de ³²P y ³⁵S pudo comprobarse una asimetría en la distribución de aminoácidos en ambos dominios, definiendo a X/X' como un dominio rico en metionina y no fosforilado, y a Y/Y' fosforilado y con pocas metioninas (fig. 2). La fosforilación se da principalmente en serina y alguna treonina, no observándose en residuos de tirosina⁴¹. Tres de las 7 Ser localizadas en la secuencia de ADNc obtenida por Rauh et al⁴², concretamente las situadas en las posiciones 339, 375 y 762, se situaron en regiones altamente ácidas con residuos de Glu y Asp adyacentes, por lo que se ha sugerido que caseínas tipo II puedan ser responsables de la fosforilación de SSB/La in vivo.

Al estudiar el patrón concreto de reactividad de sueros con actividad

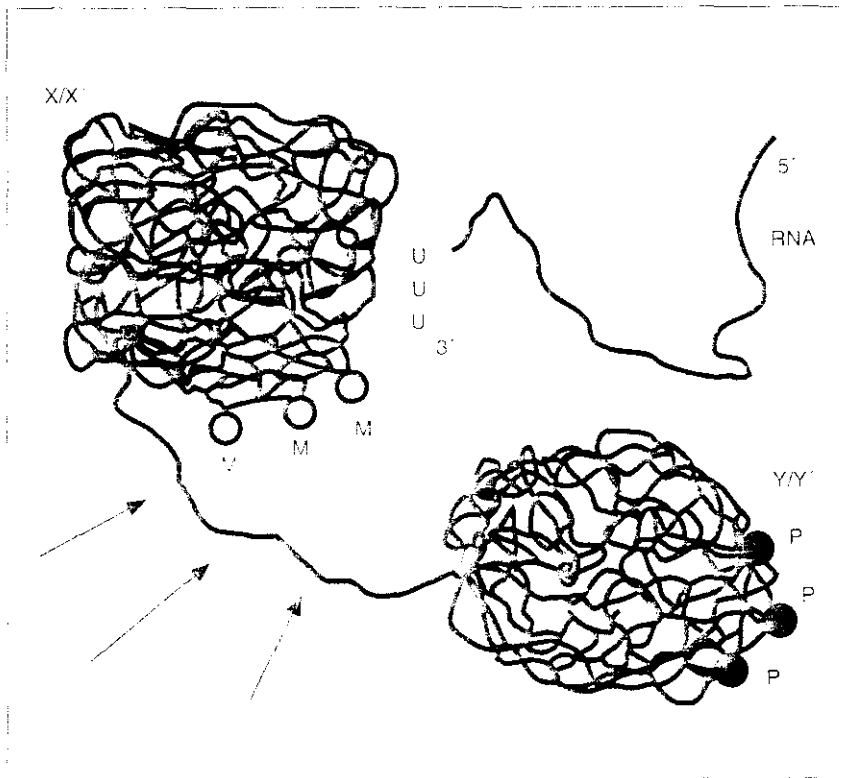


Fig. 2. Modelo estructural del autoantígeno SSB/La. Ribonucleoproteína constituida por dos dominios: un dominio X/X' de 28/29 kD que interactúa con el extremo 3'OH del ARN y que posee casi todos los residuos de metionina, y un dominio Y/Y' de 23/24 kD que contiene los residuos fosforilados. Las flechas indican los sitios de rotura proteolítica. (Adaptada de Chan y et al⁴¹.)

anti-SSB/La se ha encontrado una heterogeneidad de respuesta, observándose que el 69% reacciona con ambos polipéptidos, mientras que el 19 y el 13% lo hacen sólo con X/X' o Y/Y', respectivamente⁴¹. Otros autores⁴³ han encontrado que el 95% de sueros reaccionan con X/X', 82% con Y/Y' y sólo un 1% lo hace exclusivamente con Y/Y'. En ninguno de estos estudios se aportó una correlación con la clínica de los pacientes.

El hallazgo de que la proteína SSB/La formaba partículas ribonucleoproteicas (RNP) con transcritos recién formados de la ARN polimerasa III, condujo a pensar que podría tener un papel importante en la transcripción y actuar como cofactor de esta enzima⁴¹. Gottlieb y Steiz demostraron que efectivamente esta proteína era un factor de transcripción de la ARN polime-

rasa III y que actuaba en la terminación y liberación de transcritos⁴¹. Se ha comprobado que la transcripción mediada por esta enzima se inhibe fuertemente cuando se depleciona SSB/La con anticuerpos anti-La pudiendo revertirse ésta al añadir otra vez la proteína⁴¹. Se sabe que la asociación a estos transcritos recién sintetizados ocurre en el dominio X/X' (fig. 2), y que para esta unión se requieren^{40,45,46} tres o más residuos de U seguidos de un grupo OH en el extremo 3'.

Los ARN a los que se asocia SSB/La incluyen entre otros pre-ARNt, precursores de 5S ARN, U1 ARN (transcrito por la ARN polimerasa II), 4.5S ARN, 7S ARN (en células Raji), 7.2S ARN (células HeLa), Y5 RNA y algunos RNA codificados por virus como VAI y VAII de adenovirus y EBER 1 y 2 de Epstein-Barr (EBV) entre otros^{47,48} (tabla I).

Mcneilage et al⁴⁹ encontraron que 34 de 34 sueros con actividad anti-SSB/La inmunoprecipitaban EBER 1 y 2 en líneas celulares transformadas por este virus. La asociación de estos pequeños RNA codificados por EBV con la proteína SSB/La, junto al hecho de que EBER 1 y 2 son transcritos por la ARN polimerasa III, sugiere que EBV puede estar involucrado en iniciar la respuesta autoinmune hacia este antígeno en una persona predispuesta genéticamente a padecer SS¹. Baboonian et al⁵⁰ propusieron un posible mecanismo de autoinmunización al demostrar que la infección de glándulas salivales con adenovirus 2 conduce tanto a un aumento en la concentración del antígeno como a su expresión en la superficie celular, lo que provocaría una respuesta celular y humoral dirigida no sólo a antígenos virales, sino a la propia molécula expresada en membrana, originándose la inflamación característica del SS.

En 1985, Chambers et al⁵¹ aislaron por primera vez clones de ADN genómico y ADNc de la proteína SSB/La humana. La naturaleza de la proteína obtenida se encontró que era hidrofílica con un 40% de residuos cargados, corroborando los estudios previos sobre su naturaleza soluble⁴⁰.

En la mitad de la molécula se observó una larga zona de alrededor de 130 aminoácidos con estructura en alfa-hélice que poseía un epitopo fuertemente inmunorreactivo y que contenía la secuencia RNP consenso característica de proteínas que unen ARN (tabla II). Esta región está incluida en la mayoría de las proteínas eucariotas que unen ácidos nucleicos^{41,42}.

Se ha encontrado una gran semejanza entre SSB/La y la *DNA-binding protein* (DBP) de 72 kD presente en adenovirus (tabla III). Las dos son fosfoproteínas con múltiples puntos isoelectrónicos que se han relacionado con el grado de fosforilación, y en ambas esta fosforilación ocurre en residuos de serina y treonina⁵². Además, la DBP de adenovirus contiene también dos dominios de 44 y 26 kD resistentes a proteasas, de los cuales el de mayor

tamaño y rico en metionina, une ADN, participa en la replicación de ADN viral, especialmente en los pasos de iniciación y elongación de la cadena, y se ha visto que está muy conservado entre distintos subgrupos de adenovirus. En el caso de SSB/La, el sitio de unión a ARN se encuentra también en el dominio mayor X/X', aunque no se ha estudiado^{41,45} si esta región está más conservada que el dominio Y/Y'.

Caracterización molecular y mapeo de autoepitopos en SSB/La

La posibilidad de obtener grandes cantidades de este antígeno para su estudio y aplicación al diagnóstico de las enfermedades autoinmunes se ha visto dificultada por el bajo rendimiento obtenido, menos del 7% en los procesos de purificación convencionales⁴⁰.

El empleo de tecnología basada en ADN recombinante ha posibilitado tanto la obtención de cantidades suficientes de este antígeno para el montaje de técnicas de uso diagnóstico, como la caracterización de los autoepitopos reconocidos.

En 1985, Chambers et al⁵² aislaron por primera vez clones de ADNc de la proteína de hígado humano a partir de bibliotecas genómicas construidas en λ gt11. Los clones de ADNc obtenidos se expresaron en *E. coli* como proteínas de fusión comprobándose la existencia de un inserto de 390 pares de bases que producía una proteína de fusión de 129 kD, alrededor de 13 kD mayor que la betagalactosidasa, y que se encontró reactiva con anticuerpos anti-SSB/La. De este inserto de 390 pares de bases, se vio que 360 codificaban para 122 aminoácidos de la región carboxiloterminales de la proteína. En otro inserto de ADNc, se encontró que la secuencia codificante incluía sólo los 55 aminoácidos carboxiloterminales. Debido a que este segundo clon también reaccionó con anticuerpos anti-SSB/La, se concluyó que al menos un sitio antigénico residía en esta región de la molécula que constituye el 12% de la proteína humana.

Al secuenciar esta región, se observó un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos. Por análisis de hidrofobicidad, se identificó un decapeptido situado entre los aminoácidos 40 y 49 con una alta probabilidad de ser expuesto en la superficie y, por tanto, de ser un determinante antigénico.

Posteriormente Sturgess et al⁵³ aislaron clones de ADNc humano de esta molécula a partir de bibliotecas construidas en λ gt10.

La sonda utilizada para la detección de este ADNc se obtuvo a partir de la secuencia publicada anteriormente por el grupo de Chambers. El ADNc de la proteína fue subclonado y expresado en *E. coli* como proteína de fusión, detectando al analizar los lisados de cultivos un polipéptido de aproximadamente 40 kD que reaccionó con todos los sueros con actividad anti-La no haciéndolo con los que carecían de esta actividad.

Al comparar esta secuencia con la publicada previamente, se observó que ambos clones poseían una secuencia idéntica de 132 bases hasta que se alteraba una citosina. Esto provocó que en el clon descrito por Chambers et al⁵² se alterara el marco de lectura creándose un codón de terminación en posición 165, mientras que éste continuaba 926 bases.

Para el mapeo de autoepitopos generaron fragmentos no solapantes del ADNc de SSB/La por medio de una combinación de digestiones enzimáticas, ligándose en vectores de expresión de la serie pUR. El subclón La I (bases 1 a 251) no se mostró inmunorreactivo con sueros anti-SSB/La. El subclón La II (bases 252 a 755) no produjo proteína de fusión estable. El subclón La III (756 a 3') produjo una proteína muy inmunorreactiva, lo que demostró la existencia de al menos un epítipo en los 103 aminoácidos de la región carboxiloterminales. No obstante, no se pudo excluir la presencia de otro autoepítipo en el subclón La II debido a que se produjo proteína de fusión estable. Del mismo modo, se postuló que la propia fragmentación podría haber destruido algún otro epítipo adicional.

Simultáneamente a los trabajos del grupo de Sturgess, Rauh et al⁵² situaron al menos 3 epítipos en la mitad carboxiloterminales de la molécula.

A partir de una biblioteca de ADNc de la proteína de hígado humano construida en λ gt11, aislaron un clon que reaccionaba con una mezcla de suero de pacientes con LES y SS.

Al secuenciarlo obtuvieron una secuencia nucleotídica que codificaba para un polipéptido de 296 aminoácidos, cuyo tamaño era aproximadamente de 33 kD, y que daba cuenta del 70% de la proteína completa. La identificación tanto del sitio como de la señal de poliadenilación indicó que se trataba de la región carboxiloterminales. Se observaron 2 metioninas en la región aminoterminales, así como 7 serinas en la porción carboxiloterminales, corroborando los estudios previos de Chan et al⁵¹.

Para definir los autoepitopos en esta molécula, se expresaron fragmentos solapantes del inserto en *E. coli* y se analizaron las proteínas recombinantes con antisuero anti-SSB/La. Los resultados mostraron la existencia de tres regiones antigénicas en la mitad terminal de la molécula denominándolas La A (residuos 112-180), La B (residuos 181-233) y La C (234-268). Anticuerpos eluidos de la interacción con cualquiera de estas proteínas no mostraron reactividad cruzada con las otras, indicando que estos epítipos no están relacionados inmunológicamente.

La localización de estos tres epítipos en la molécula no pudo excluir la existencia de otros, ya que, aparte de que el clon aislado por Chambers et al⁵² no se incluía en esta secuencia, pueden existir otros determinantes antigénicos que sólo se reconozcan en la conformación nativa de la proteína⁵³.

El grupo de St. Clair et al⁵⁴ aisló clones de ADNc correspondientes a la proteína humana completa. A partir de aquí, y utilizando el vector de expresión λ gt11 expresado en *E. coli* Y1089, obtuvieron tres fragmentos representativos de la totalidad de la molécula como proteínas de fusión a betagalactosidasa.

Al analizar la reactividad por medio de un ensayo en fase sólida⁵⁵, encontraron que los anticuerpos anti-La reconocían los tres, aunque en distinta medida. En la mayoría de los sueros, el fragmento correspondiente a la región media de la molécula (La C) se mostró como el más inmunorreactivo, produciendo niveles de unión comparables con los obtenidos frente al fragmento que definía las tres cuartas partes de la región carboxiloterminale de la secuencia (La B). La reactividad frente a la región aminoterminal (La A) se mostró intermedia, mientras que la encontrada frente a La D (región carboxiloterminale) fue la más débil.

En los trabajos de Chambers et al⁵², se obtuvo una secuencia parcial de 55 aminoácidos carboxiloterminales de la proteína SSB/La. Sin embargo, el error de omisión de una citosina alteraba el marco de lectura de manera que aparecía un codón de terminación prematuro. Con el aislamiento y expresión de clones ADNc adicionales, se comprobó que esta secuencia realmente residía en la región aminoterminal (definida aquí como La A).

Los resultados obtenidos por St. Clair et al coincidieron parcialmente con los publicados por el grupo de Sturgess⁵³ en los que también se encontró que la región carboxiloterminale de SSB/La contenía un epítipo inmunorreactivo. Sin embargo, en sus experimentos no consiguieron una proteína de fusión estable que expresara la región media. Por otra parte, este mismo grupo no observó ningún epítipo situado en la porción aminoterminal, debiéndose esta falta de reactividad a que su secuencia carecía de 52 aminoácidos aminoterminales presentes en La A, e incluía 37 residuos que en esta región no se encuentran.

McNeilage et al⁵⁶ han descrito la existencia de un epítipo discontinuo en SSB/La. Para ello obtuvieron por PCR seis fragmentos solapantes de la región de ADN correspondiente a 107 aminoácidos del extremo aminoterminal. Después de subclonarlos en pGEX-2 y expresarlos como proteína de fusión a glutatión S transferasa, analizaron la reactividad de los péptidos obtenidos, en-

contrando que los sueros con actividad anti-SSB/La sólo reaccionaban con La A1 (residuos 12-107) y La A4 (residuos 1-99) no haciéndolo con ninguno de los fragmentos restantes. Esto, junto al hecho de que las regiones 12-28 y 82-99 sólo estaban presentes en estos dos fragmentos, permitió a este grupo definir un epítipo discontinuo o conformacional.

La obtención de clones de ADNc que expresan fragmentos de SSB/La ha permitido localizar los fragmentos inmunorreactivos de esta molécula, indicando que múltiples epítipos son reconocidos por sueros autoinmunes. Esto apoyaría la idea de que las reactividades cruzadas no son la única causa de que un antígeno propio se reconozca como extraño¹².

No obstante, el análisis de autoepítipos por técnicas basadas en ADN recombinante se enfrenta a una serie de inconvenientes como son el hecho de que la utilización de fragmentos de aproximadamente 100 residuos, puede traer consigo el enmascaramiento de algún epítipo preferencial dentro de la respuesta policlonal del suero. Del mismo modo, la propia fragmentación puede originar la desaparición de algún determinante antigénico presente en esta secuencia. Igualmente, hay que valorar las posibles modificaciones estructurales que pueda sufrir la proteína debidas tanto a su fusión a betagalactosidasa como a su obtención de fuentes procariontas. Es posible que los fragmentos obtenidos a partir de la molécula completa no guarden la misma estructura tridimensional que en la proteína nativa, existiendo además la posibilidad de que no todos presenten sus epítipos con igual eficacia. Para ser capaces de valorar este hecho, se requerirían estudios de estructura tridimensional que en el caso de esta molécula no se han realizado.

Sin embargo, estudios de inhibición realizados entre la proteína recombinante y la obtenida de fuentes tisulares muestran que, en general, hay una similitud entre los determinantes antigénicos expresados en los fragmentos recombinantes y

aquellos presentes en proteínas de mamífero⁵⁴.

Aplicaciones del antígeno SSB/La obtenido de forma recombinante

Los estudios llevados a cabo con este antígeno obtenido de forma recombinante se han encaminado a definir la especificidad de epítipos reconocidos por sueros autoinmunes y a buscar correlaciones con manifestaciones clínicas particulares.

St. Clair et al⁵⁷ desarrollaron un ensayo de ELISA con antígeno recombinante humano representativo de la proteína completa, así como de las regiones amino (La A), media (La C) y carboxiloterminale (La D).

Con este ensayo se buscó definir la especificidad de respuesta en 41 pacientes con SS primario de los cuales 21 presentaban manifestaciones extraglandulares, y en diez con SS asociado a otras enfermedades del tejido conjuntivo.

En 31 de 51 pacientes se observó reactividad con la molécula completa; del total de pacientes, 25 de 41 padecían SS primario y 6 de 10 SS asociado a otras manifestaciones. En este grupo de 31 sueros con actividad anti-La, 26 reaccionaban con La A, 18 con La C y sólo 13 lo hacía con La D, indicando un patrón preferencial de reactividad hacia La A y La C.

Aun cuando se observó que A y C eran los más inmunorreactivos, la unión absoluta y relativa por ELISA, se encontró que difería entre los sueros. Los resultados indicaron que estos pacientes producían anticuerpos frente a, como mínimo, 3 epítipos distintos en el antígeno SSB/La.

Otro dato importante es que no se observaron diferencias en la unión a los tres fragmentos entre los pacientes con SS primario y SS asociado. Lo que sí se demostró fue una mayor prevalencia de reactividad en los individuos con manifestaciones extraglandulares (15 de 21) que sin ella (10 de 20).

Al analizar si existía correlación entre una manifestación extraglandular concreta y una especificidad

de epitopo dada no se encontró, sugiriendo que la expresión clínica de enfermedad extraglandular en SS no depende estrictamente de una respuesta de autoanticuerpos frente a un determinante antigénico particular.

Gordon et al⁵⁸ desarrollaron otro ensayo de ELISA para analizar si hay correlación entre la cantidad de anticuerpo anti-SSB/La y la hipergammaglobulinemia vista en pacientes con SS primario, encontrando que la cantidad de anticuerpo específico medida en 84 sueros variaba entre 0,02 y 11 mg/ml, con un 61% de los sueros con concentraciones superiores a 1 mg/ml, contribuyendo notablemente, por tanto, a la hipergammaglobulinemia. También se observó una variación considerable entre las tres proteínas de fusión (La A: 0,7, La C: 0,3, La D: 0,034 mg/ml).

Sin embargo, en algunos pacientes con hipergammaglobulinemia y bajas cantidades de anticuerpos anti-La, no se observó correlación entre los niveles de esta actividad y la IgG total. Las causas de esta falta de correlación no están claras, como tampoco lo está la relación entre la respuesta a esta proteína y los niveles elevados de IgG con la patogenia de SS.

No obstante, lo que sí parece indicar, apoyándose en estudios en los que fluctuaciones en las concentraciones de este autoanticuerpo no están unidas a cambios en los niveles de IgG, es que la regulación de autoanticuerpos frente a esta proteína es independiente de otras inmunoglobulinas, apoyando la idea de que estos autoanticuerpos son generados por autoinmunización más que por activación policlonal B indiscriminada.

ANTICUERPOS ANTI-Sm Y U1 RNP

En el año 1959, Holman et al⁵⁹ describen por primera vez la presencia en el suero de pacientes con LES, de anticuerpos reactivos con un antígeno nuclear distinto de ADN y nucleoproteína. Poco después, Tan y Kunkel⁶⁰ demuestran que una proporción significativa de

sueros de estos pacientes presentan una banda de precipitación en gel cuando se enfrentan a extractos tisulares solubles. Uno de estos sueros pertenecía a un paciente cuyas iniciales del primer apellido eran Sm, por lo que se adoptó este nombre para el antígeno.

Pocos años después de que Tan y Kunkel describieran el sistema Sm anti-Sm, Mattioli y Reichlin encontraron la presencia en el suero de un paciente con LES de anticuerpos frente a un antígeno muy lábil⁶¹. Debido a que los tratamientos del extracto antigénico con tripsina y ARNasa hacían que éste perdiera la capacidad de reaccionar con los sueros, lo definieron como ribonucleoproteína. Siguiendo la nomenclatura empleada por Tan y Kunkel, llamaron a este antígeno Mo, nomenclatura que posteriormente sería sustituida por U1 RNP.

Los anticuerpos anti-Sm y anti-U1 RNP reconocen pequeñas partículas ribonucleoproteicas (RNP) presentes en el núcleo de todas las células eucariotas (tabla I)^{62,63}. La primera evidencia de que existen dos formas moleculares reconocidas por ambos tipos de sueros, la obtuvieron Mattioli y Reichlin analizando sueros con actividad anti-Sm y anti-RNP por técnicas de inmunodifusión en gel. La identificación de bandas de identidad parcial entre ambos tipos de sueros, les lleva a pensar que ambos comparten un determinante antigénico, o que algunas moléculas de Sm y RNP están físicamente asociadas⁶⁴.

La evidencia definitiva de la existencia de dos formas moleculares, una que contiene determinantes antigénicos exclusivos de Sm, y otra que contiene determinantes de Sm y RNP, la aportaron Lerner et al al analizar la naturaleza de las partículas reconocidas por ambos tipos de sueros⁶⁵. Utilizando técnicas de inmunoprecipitación, describieron los componentes de ARN y proteína de estas partículas, encontrando que antisueros anti-Sm precipitan 5 ARN pequeños de la serie U (definidos así por su alto contenido en uracilo) denominados U1, U2, U4, U5 y U6, mientras que los anti-RNP sólo precipitan el ARN U1.

Esto les llevó a postular que si las partículas ribonucleoproteicas son consideradas una familia, los sueros con actividad anti-Sm precipitan todos los miembros de ésta, mientras que los anti-RNP sólo lo hacen con uno. Estos resultados volvieron a sugerir que los determinantes antigénicos reconocidos por ambos tipos de sueros eran distintos, dato que se comprobó al encontrar que sueros que contienen exclusivamente anticuerpos anti-RNP, no son capaces de inhibir la unión de un anticuerpo monoclonal anti-Sm de ratón MRL a antígeno de timo de conejo⁶⁵.

El componente ARN de estas partículas se agrupa dentro de la misma familia debido a que todos, con la excepción de U6, poseen una estructura trimetil cap en el extremo 5' terminal, así como una secuencia interna del tipo AUUUUUG referida comúnmente como sitio de unión Sm a través del cual interaccionan estos ARN con las proteínas^{63,66}. En mamíferos se han descrito al menos 13 ARN de la serie U, la mayoría de las cuales se ha demostrado que existen formando complejos con proteínas en forma de pequeñas partículas ribonucleoproteicas (snRNP). Las snRNP más abundantes son U1, U2, U5 y U4/U6, estimándose que existen alrededor de 2×10^5 copias de U5 y U4/U6, y 10^6 copias de U1 y U2 por célula de mamífero⁶². Todas estas snRNP se localizan dentro del nucleoplasma y son precipitadas por anticuerpos anti-Sm (tabla IV).

Debido a que el componente proteico de estas partículas es requerido para su antigenicidad⁶⁷, la aplicación de técnicas de WB ha permitido analizar tanto los polipeptidos presentes, como los patrones de reactividad de sueros autoinmunes^{65,68,69}. Actualmente se acepta la existencia de una serie de polipeptidos comunes conocidos como proteínas del core, y que en humanos se denominan B', B, D, E, F y G con pesos moleculares de 29, 28, 16, 12, 11 y 9 kD, respectivamente. Además de estas proteínas comunes, algunas partículas ribonucleoproteicas contienen polipeptidos exclusivos que las caracterizan. Así,

TABLA IV. Composición y reactividad de autoanticuerpos de las partículas ribonucleoproteicas de la serie U

Partícula	Polipeptidos	ARN	Reactividad con anticuerpos
U1 RNP	70 kD, A (33), C (22), B'/B (29/28), D (16), E (12), F (11) y G (9)	U1	Anti-Sm, anti-U1 RNP
U2 RNP	A' (31), B'' (26,5), B'/B, D, E, F y G	U2	Anti-Sm, anti-U2 RNP
U5 RNP	8 proteínas*, B'/B, D, E, F y G	U5	Anti-Sm, anti-U5 RNP
U4/U6 RNP	150 kD, B'/B, D, E, F y G	U4/U6	Anti-Sm, anti-U4/U6 RNP

Entre paréntesis se expresa el peso molecular de cada polipeptido.

*La partícula U5 contiene ocho polipeptidos y los anticuerpos anti-U5 RNP se unen al menos cuatro de ellos.

U1 RNP incluye los polipéptidos A (33 kD) C (22 kD) y 70 kD, y U2 RNP las proteínas A' (31 kD) y B'' (26,5 kD) (tabla IV).

Mientras que los anticuerpos anti-Sm reconocen las proteínas B', B, D, E, F y G comunes a todas estas partículas, los polipéptidos exclusivos de un tipo de partícula RNP también son reconocidos por sueros autoinmunes. Así, los anticuerpos anti-U1 RNP reconocen las proteínas A, C y 70 kD exclusivas de U1, mientras que anticuerpos anti-U2 RNP reaccionan con los polipéptidos A' y B'' de U2 RNP (tabla IV).

Habets et al⁶⁷ analizaron por WB la reactividad de sueros anti-Sm y anti-U1 RNP con los polipéptidos de estas partículas, encontrando que la mayoría de los que poseen actividad anti-Sm reconocen el doblete B'/B junto con el polipéptido D, mientras que los sueros anti-U1 RNP, aunque reconocen B'/B débilmente, reaccionan con preferencia con las proteínas de 70 kD, A y C específicas de U1.

Las primeras aproximaciones al estudio de la función de estas snRNP vinieron de los trabajos llevados a cabo por Lerner et al⁶⁵ quienes comprobaron la existencia de una secuencia en el extremo 5' de U1 ARN exactamente complementaria a una secuencia común a todos los precursores de ARN mensajero. Esto les llevó a postular una participación activa de U1 RNP en el procesamiento de ARN, dato que fue comprobado al demostrarse la inhibición de este mecanismo por me-

dio de sueros con actividades anti-Sm y anti-U1 RNP.

Actualmente hay evidencias de que estas partículas snRNP desempeñan un papel activo en el procesamiento de transcritos recién sintetizados de ARN o pre-ARNm, participando en la eliminación de regiones no codificadoras o intrones y en el posterior religamiento de secuencias codificadoras adyacentes o exones (tabla I)⁶⁶. Las partículas snRNP se organizan en un complejo macromolecular llamado cuerpo de procesamiento o espliceosoma originado inicialmente por el apareamiento entre el extremo 5' de U1 ARN y el sitio 5' de procesamiento y para el que se requiere la presencia de las proteínas de U1 RNP⁶². En la rotura del sitio de procesamiento 5', un residuo de guanina 5' terminal del intrón forma un enlace fosfodiéster con un residuo de adenina localizado en una secuencia conservada conocida como el sitio de ramificación situado de 20 a 50 nucleótidos *upstream* del sitio 3' de procesamiento. Este paso requiere la unión de U2 RNP, así como de proteínas auxiliares. Posteriormente, el corte se da en el sitio 3' de procesamiento participando activamente U5 RNP. La partícula U4/U6 sirve como catalizador de esta reacción que origina la liberación del intrón y la posterior unión de exones adyacentes⁶⁶.

Como cabría esperar por su papel activo en el procesamiento de pre-ARNm, tanto el componente proteico como los U ARN se encuentran

altamente conservados en la evolución^{62,63,70}. Lerner et al⁶⁵ analizaron el grado de conservación de estos autoantígenos empleando para ello anticuerpos anti-Sm y anti U1-RNP en estudios de inmunoprecipitación de material marcado con ³²P procedente de células de varias especies, encontrando que estos sueros precipitaban snRNP tanto de humano, ratón o pollo como de insectos.

Los anticuerpos anti-Sm se dan aproximadamente en el 25% de los pacientes con LES, mientras que los anti-U1 RNP aparecen con una frecuencia que oscila entre un 25 y un 30% de individuos con LES, normalmente asociados a la aparición simultánea de anticuerpos anti-Sm. Cuando los anti-U1 RNP se dan solos y en título alto, se considera marcador de la EMTC, entidad en la que aparecen con una incidencia del 85%^{62,69}.

Clonaje y caracterización molecular de los polipéptidos snRNP

Proteínas del core

Polipéptido/s B'B. Dentro del grupo de polipéptidos comunes a todas las partículas ribonucleoproteicas, las proteínas B'/B son, junto al polipéptido D, las más antigénicas. Mientras que algunos autores postulan, basándose en un patrón de proteólisis semejante, que B'/B son los productos traslacionales de un mismo ARNm y que una modificación covalente o una rotura proteolítica origina una especie a partir de la otra⁷⁰, otros hablan de la existencia de dos especies de ARNm separadas⁷¹. Ambos polipéptidos están presentes en todos los tejidos humanos excepto B' que no aparece en células neuronales. Estas últimas contienen la proteína N que, aunque también pertenece al grupo de proteínas del core y posee un peso molecular parecido al de B', es el producto de un gen separado⁶².

Ohosone et al⁷¹ aislaron en 1989 clones de ADNc de la proteína B. Utilizando un primer clon que poseía una secuencia de 780 bases codificante para un segmento del polipéptido B reconocido exclusiva-

mente por sueros con actividad anti-Sm y anti-U1 RNP, aislaron clones que contenían un inserto mayor, y que codificaban para el polipéptido B completo con 285 aminoácidos y un peso molecular estimado de 29,6 kD.

Al analizar la secuencia se encontró un alto porcentaje de prolinas (20%), una estrecha homología con la proteína N de Sm, así como la existencia de un motivo PP/aPGMR/iPP que se postula que puede intervenir en la interacción proteína-proteína de las partículas RNP (tabla II).

En este mismo año, Rokeach et al⁷⁰ describieron el aislamiento de clones de ADNc que codifican para ambos polipéptidos. Para ello construyeron a partir de células Raji una biblioteca de ADNc en λ gt10. Para la localización de los clones sintetizaron una sonda basándose en la identidad de la secuencia aminoterminal de B' y B.

En la estructura secundaria se localizaron una serie de regiones hidrofílicas e hidrofóbicas alternantes a lo largo de la molécula, así como una marcada predisposición a formar giros beta que podrían ser susceptibles de constituir un determinante antigénico. Igualmente, se identificó el motivo PP/aPGMR/iPP encontrado en B (tabla II).

Simultáneamente a este trabajo, Sharpe et al⁷² utilizaron un anticuerpo monoclonal anti-Sm para analizar una biblioteca de ADNc de células HeLa en λ gt11. La identificación de un clon con un inserto de 700 pares de bases y la posterior expresión como proteína de fusión a betagalactosidasa, les permitió comprobar la reactividad con sueros con actividad anti-Sm. La secuencia descrita fue semejante a la obtenida por Rokeach et al⁷⁰.

El clonaje y la obtención de la secuencia de estos polipéptidos ha permitido discutir sobre la naturaleza de las proteínas B' y B reconocidas por los sueros anti-Sm. Aunque los grupos de Rokeach y Sharpe^{70,72} describen el ADNc obtenido como responsable de la síntesis de los polipéptidos B' y B, el análisis comparativo de su secuencia con la descrita por Ohosone et al⁷¹ para el

polipéptido B, sugiere que el ADNc clonado por los primeros codifica exclusivamente para el polipéptido B' de Sm. La comparación de las secuencias obtenidas por estos grupos no arroja diferencias significativas salvo en ciertas posiciones de divergencia entre B, B' y N. El polipéptido B' carece de 50 aminoácidos de la región carboxiloterminale que sí están presentes en B, apoyando la idea de mecanismos de procesamiento alternativos para cada uno de ellos a partir de un único tránsito de ARN. El reconocimiento simultáneo de B' y B por los sueros autoinmunes sugiere la presencia de al menos un epítipo en las regiones conservadas de estos polipéptidos y por extensión de N.

En ambas proteínas se ha encontrado un alto porcentaje de prolinas (aproximadamente el 20%), característica encontrada en otras proteínas que unen ácidos nucleicos. Sin embargo, no se ha identificado la región RNP consenso relacionada con esta propiedad, lo que sugiere que estos polipéptidos no interactúan directamente con los ARN de la serie U⁷¹.

Polipéptido D. Dentro también de los polipéptidos comunes a todas las partículas ribonucleoproteicas, el D de 16 kD es otro de los que mayor antigenicidad posee. Aunque normalmente su reconocimiento se asocia al de las proteínas B'/B, se ha descrito la existencia de sueros de pacientes con LES y de anticuerpos monoclonales anti-Sm que reconocen exclusivamente esta proteína, postulándose la existencia tanto de epítopos compartidos con B'/B como de epítopos únicos⁶⁷.

En 1988, Rokeach et al⁷³ aislaron un clon de ADNc codificante para este polipéptido. Para ello analizaron una biblioteca de ADNc de linfocitos B humanos construida en λ gt10 con una sonda radiomarcada obtenida a partir de la secuencia de la región aminoterminal del polipéptido D aislado de células HeLa.

En la estructura secundaria se predijo la existencia de dos regiones de carácter altamente hidrofílico en la mitad carboxiloterminale de la molécula; una localizada entre los resi-

duos 86 y 92 y con elevado contenido en lisina, y otra formada por repeticiones de la secuencia glyarg, sugiriéndose que estos dos dominios permanecen expuestos en la superficie de la molécula pudiendo constituir determinantes antigénicos que son susceptibles de ser reconocidos.

Al comparar la secuencia de este polipéptido con la de otras proteínas se encontró, como cabría esperar de una proteína con alto contenido en lisina y arginina, una gran homología con una región conservada de las protaminas, así como con el antígeno nuclear de Epstein-Barr EBNA-1 (tabla III). Sin embargo, tampoco pudo identificarse la secuencia RNP consenso encontrada en proteínas que unen ARN y ADN. Aunque el reconocimiento del polipéptido D se suele asociar al de B'/B, no se encontró ninguna homología de secuencia entre ambos, pudiendo explicarse esta reactividad cruzada por la existencia de epítopos altamente conformacionales reconocidos simultáneamente en ambas proteínas.

Polipéptido E. Este polipéptido de 12 kD perteneciente también al grupo de proteínas del core, raramente se reconoce por los sueros anti-Sm. Debido a esto, el clonaje y secuenciación de esta proteína se ha dirigido más al análisis de su papel en las partículas ribonucleoproteicas.

En 1988, Stanford et al⁷⁴ aislaron un clon de ADNc de la proteína E. Utilizando un clon de ADNc parcial obtenido anteriormente⁷⁵, analizaron una biblioteca de ADNc de células de teratoma humano, aislando un clon cuyo producto primario de traslación codificaba para un polipéptido de 10,8 kD reactivo con anticuerpos anti-Sm.

Al comparar la secuencia con otras publicadas previamente, no encontraron homologías con proteínas que unen ácidos nucleicos. La secuencia RNP consenso tampoco apareció en este polipéptido, por lo que se sugirió que esta proteína tampoco es responsable de la interacción con el sitio de unión Sm de los ARN de la serie U^{63,66}.

No obstante, se encontró que el polipéptido E presentaba homología de secuencia con la proteína ribosomal de levadura *vari* (tabla III) identificándose 31 sustituciones conservadas y 17 posiciones de identidad entre ambas, apoyando los comentarios de algunos autores que hablan de una similaridad entre el cuerpo de procesamiento o espiroscosoma en el que estas proteínas participan activamente, y el ribosoma. La aparición de anticuerpos antirribosomales en el suero de pacientes con LES se suele asociar con la aparición simultánea de anticuerpos anti-Sm⁷⁶.

Polipéptidos exclusivos de U1 RNP

La demostración⁷⁴ de la existencia de autoanticuerpos que precipitan exclusivamente la partícula U1 ha permitido definir serológicamente un síndrome caracterizado por una combinación de características del LES, esclerosis sistémica y polimiositis. Este síndrome conocido como EMTC se caracteriza por la elevada frecuencia de aparición de autoanticuerpo anti-U1 RNP a títulos altos⁶⁰.

El hallazgo de que tres proteínas de la partícula ribonucleoproteica U1, conocidas como A (33 kD), C (22 kD) y el polipéptido de 70 kD son reconocidas por los anticuerpos anti-U1 RNP, ha dirigido los estudios a determinar la identidad y especificidad de reconocimiento de estos autoantígenos⁶². Habes et al⁶⁷ encuentran que el 87% de los sueros con actividad anti-U1 RNP reconocen la proteína de 70 kD, el 67%, la proteína A, y el 60%, el polipéptido C.

Polipéptido C de U1 RNP. Yamamoto et al⁷⁷ obtuvieron en el año 1988 el polipéptido C de U1 RNP como proteína de fusión. Utilizando el suero de un paciente con altos títulos de anticuerpos anti-U1 RNP, identificaron un clon de ADNc obtenido a partir de una biblioteca de fibroblastos humanos construida en λ gt11. Al analizar la secuencia de esta proteína no se encontró homología significativa con ninguna de las proteínas clonadas hasta el mo-

mento⁷⁷. Si se identificó en cambio el motivo PP/aPGMR/iPP descrito en las proteínas B'/B y que se postula puede intervenir en la interacción proteína-proteína de las partículas RNP (tabla II).

Polipéptido A de U1 RNP. Sillekens et al⁷⁸, utilizando el suero de un paciente con EMTC, analizaron una biblioteca de ADNc preparada a partir de células de teratocarcinoma humano, identificando un clon que poseía la secuencia completa del polipéptido A de 32 kD.

En la secuencia de aminoácidos deducida se identificaron dos regiones situadas en las mitades carboxilo y aminoterminal con una elevada homología con la proteína B'' de la partícula U2 RNP, apoyando los trabajos previos de Reuter et al⁷⁹ en los que demuestran utilizando un anticuerpo monoclonal, que el polipéptido B'' asociado a U2 RNP comparte un epítipo con esta proteína. Además, en una de estas regiones de homología con B'', concretamente entre los aminoácidos 52 y 59, se identificó el octámero RNP consenso descrito en otros autoantígenos como SSA/Ro, SSB/La y la proteína de 70 kD asociada a U1 RNP^{27,29,52,80}. Análogamente a las proteínas B, B' y C, se localizó un segmento con un elevado contenido en prolina (tabla II).

Polipéptido de 70 kD asociado a U1 RNP. Theissen et al⁸⁰, utilizando antisueros poli y monoclonales específicos de este polipéptido, aislaron un clon de ADNc que codificaba para esta molécula.

Al secuenciar el inserto de 2,7 kb que poseía este clon, encontraron que cerca del 20% de los aminoácidos eran argininas. El perfil de hidrofobicidad reveló pocas regiones hidrofóbicas, encontrando que la mayor parte de la proteína presentaba una elevada hidrofiliidad, en especial la región carboxiloterminal en la que se localizó una zona de aproximadamente 40 aminoácidos con un elevado contenido en argininas (50%). De forma semejante a lo observado en las protaminas, la mayoría de las argininas se situaban en grupos de tres o cuatro separadas

por serinas o aminoácidos ácidos. Esta región rica en argininas, se postula que puede participar activamente en la unión de esta proteína con el RNA U1 al identificarse una secuencia RNP consenso (tabla II)⁸¹.

Utilización de polipéptidos RNP recombinantes en el diagnóstico clínico

Habets et al⁸² desarrollaron en 1989 un ensayo de ELISA con los polipéptidos B'', A y 70 kD obtenidos como proteínas de fusión a betagalactosidasa, y compararon los resultados obtenidos en una población de 337 muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes y 66 individuos sanos, con los aportados por WB de extracto nuclear de células HeLa. En el caso del polipéptido de 70 kD encontraron 35 sueros de sujetos con EMTC que reaccionaban con esta proteína por ambas técnicas y 13 sueros positivos en ELISA y negativos en WB. Los resultados discordantes se justificaron por una mayor sensibilidad de ELISA debido a que ningún suero normal dio positivo por esta técnica. Aun así, tampoco pudo descartarse que en ELISA se mantengan epítipos altamente conformacionales que en el WB desaparecen.

En el caso de los polipéptidos A y B'' los resultados, por lo general, también correlacionaron. La aparición de sueros positivos en WB y negativos por ELISA les hizo pensar, basándose en que estos sueros presentaron anticuerpos antibetagalactosidasa, en una proximidad entre los sitios de unión de ambas poblaciones de anticuerpos. No obstante, esta diferencia también puede deberse a procesos de modificación sufridos por la obtención de estas proteínas de fuentes procariotas.

Seelig et al⁸³ desarrollaron en 1991 otro ensayo de ELISA para la proteína de 70 kD obtenida de forma recombinante. Para evitar los problemas de inespecificidad provocados por la fusión a betagalactosidasa⁸², obtuvieron este polipéptido como proteína de fusión a la polimerasa MS-2 del virus de la hepatitis

B frente a la que no se han detectado anticuerpos naturales.

Con la proteína así obtenida, desarrollaron un ensayo de ELISA y un WB con los que analizaron la reactividad de sueros anti-U1 RNP. De 793 sueros positivos por ELISA, el 79% podían ser confirmados también por WB. Esta diferencia se postuló que podría deberse bien a una mayor sensibilidad de la técnica de ELISA, o a la existencia de un subgrupo de sueros que reconocen epítomos altamente conformacionales en esta proteína.

A MODO DE CONCLUSIÓN

Las asociaciones entre enfermedades autoinmunes como el LES o el SS y la existencia de anticuerpos dirigidos frente a partículas ribonucleoproteicas como SSA/Ro, SSB/La, Sm y U1 RNP, han conducido a un estudio profundo sobre la naturaleza molecular de estos marcadores diagnósticos.

La aplicación de técnicas de ADN recombinante al estudio de estos autoantígenos ha permitido la identificación de características estructurales o motivos proteicos comunes en muchos de ellos (tabla II) y que sugieren una estrecha relación en su reconocimiento. Debido a que se trata de motivos proteicos altamente conservados, se ha sugerido que el sistema inmune puede responder a antígenos similares presentes en otros organismos como protozoos o helmintos. Aunque se ha encontrado poca reactividad de anticuerpos frente a estos motivos, se ha sugerido que pueden constituir epítomos reconocidos por la célula T⁷.

En las partículas ribonucleoproteicas pequeñas de la serie U, la identificación del motivo RNP consenso en los polipéptidos A y 70 kD sugiere que ambos interactúan directamente con el ARN U. La secuencia PP/aPGMR/iPP identificada en B'/B, C y A se ha implicado más en la interacción proteína-proteína en estas partículas⁷¹.

El análisis de la secuencia de estos autoantígenos ha permitido además la identificación de homologías con proteínas no relacionadas (tabla

III). En la calreticulina (SSA/Ro) se ha encontrado una homología del 63% con un antígeno del nemátodo *Onchocerca volvulus*^{32,33}. Aunque se han descrito anticuerpos que reconocen la calreticulina en el suero de sujetos parasitados por esta filaria éstos no manifiestan clínica autoinmune, indicando que se necesitaría algo más que una reactividad cruzada para el desencadenamiento de una enfermedad autoinmune³⁴. No obstante, la asociación entre anticuerpos anti-SSA/Ro y anticalreticulina no está clara. Otra homología identificada es entre el polipéptido SSA/Ro de 52 kD y la proteína *rff* humana. Sin embargo, anticuerpos anti-Ro no reconocen esta proteína, apoyando el concepto de especificidad antigénica de estos autoanticuerpos³⁵. En SSB/La se ha encontrado una homología significativa entre la región aminoterminal de la molécula y el polipéptido gag de retrovirus felino, aunque esta región de homología es sólo una parte de un epitipo conformacional de SSB/La³⁶. Además se ha identificado una homología estructural entre SSB y la proteína de 72 kD de adenovirus³⁹. En el polipéptido D de las partículas ribonucleoproteicas de la serie U, se ha encontrado una gran homología con una región conservada de las protaminas, así como con el antígeno nuclear de Epstein-Barr EBNA-1⁷³.

En el antígeno SSB/La, la obtención de fragmentos parciales de la molécula como proteínas de fusión ha permitido identificar determinantes antigénicos tanto lineales como conformacionales¹². Los estudios realizados con el objetivo de encontrar correlaciones entre el reconocimiento de determinadas regiones en SSB/La y una serie de manifestaciones clínicas particulares no han dado ningún resultado concluyente³⁷.

La obtención de estos antígenos como proteínas de fusión ha permitido el desarrollo de procedimientos de diagnóstico aplicado a estas enfermedades. En algunos de ellos se ha encontrado una buena correlación entre la forma recombinante y la obtenida de fuentes naturales^{37,82-84}.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Nieves Corrales, María Jesús Ramos, Dr. Ignacio Moneo y Miguel González la lectura crítica de este manuscrito.

Bibliografía

1. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44: 93-141.
2. Botazzo GF, Todd I, Mirakian R, Belfiore A, Pujol-Borell R. Organ-specific autoimmunity: A 1986 Overview. *Immunol Rev* 1986; 94: 137-169.
3. Lalezari P, Khorshidi M. Neutrophil and Platelet Antibodies in Immune Neutropenia and Thrombocytopenia. En: Rose NR, De Macario EC, Friedman H, Penn GM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 4.^a ed. Washington DC: ASM, 1992; 344-350.
4. Henney SC. Structural and conformational specificity of the antigen for RF. *Ann NY Acad Sci* 1969; 168: 52.
5. Rose VL, Roberts HR. Immunology of Acquired Inhibitors to Clotting Proteins. En: Rose NR, De Macario EC, Friedman H, Penn GM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 4.^a ed. Washington DC: ASM, 1992; 351-362.
6. Moreland LW, Gay RE, Gay S. Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunoph* 1991; 60: 412-418.
7. Fritzler JM, Salazar M. Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 256-269.
8. Schwartz RS, Syamal KD. Autoimmunity and autoimmune diseases. En: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, 2.^a ed. Nueva York: Raven Press, 1991; 819-866.
9. Masi AT, Mashane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1.271-1.277.
10. Harrison's principles of Internal Medicine, 12.^a ed. Nueva York: Mc Graw Hill, Inc., 1991.

11. Paxton H, Bendete T, O'Connor L, Haynes DC. Evaluation of the RheumaStrip profile test: a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SSA/Ro, SSB/La, and to native DNA. *Clin Chem* 1990; 36: 792-797.
12. Williams DG. Recombinant autoantigens. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 445-451.
13. Clark G, Reichlin M, Thomas TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1969; 102: 117-122.
14. Rodríguez Sánchez JL, Geipi Sabater C. Los sistemas antigenicos Ro y La. Aspectos moleculares y significado clínico de los anticuerpos frente a dichos antígenos. *Inmunología* 1985; 4: 15-30.
15. Alspaugh MA, Tan EM. Antibodies to cellular antigens in Sjogren's Syndrome. *J Clin Invest* 1975; 55: 1.067-1.073.
16. Alspaugh MA, Maddison P. Resolution of the identity of certain antigen antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 796-798.
17. Tsokos GC, Pillemer SR, Klippel JH. Rheumatic disease syndromes associated with antibodies to the Ro(SSA) ribonuclear protein. *Semin Arthritis Rheum* 1987; 16: 237-244.
18. Lee LA, Harmon CE, Huff JC, Norris DA. SSA/Ro antigen expression in human fetal, neonatal and adult tissues. *Arthritis Rheum* 1984; 26.
19. Boire G, Craft J. Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. *J Clin Invest* 1989; 84: 270-279.
20. Boire G, Craft J. Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J Clin Invest* 1990; 85: 1.182-1.190.
21. Yamagata H, Harley JB, Reichlin M. Molecular properties of the SSA/Ro antigen and Enzyme-linked Immunosorbent Assay for quantitation of antibody. *J Clin Invest* 1984; 74: 625-633.
22. Rader MD, O'Brien C, Liu Y, Harley JB, Reichlin M. Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1.293-1.298.
23. Ben-Chetrit E, Fox RI, Tan EM. Dissociation of immune responses to the SSA/Ro 52 Kd and 60 Kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 349-355.
24. Slobbe RL, Pruijn GJM, Damen GM, Van der Kemp CM, Van Venrooij WJ. Detection and occurrence of the 60 and 52 Kd Ro/SSA antigens and of autoantibodies against these proteins. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 99-105.
25. Chan EKL, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52 Kd component of human SSA/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 1991; 87: 68-76.
26. Boire G, López Longo FJ, Lapointe S, Ménard HA. Sera from patients with autoimmune diseases recognize conformational determinants of the 60 Kd Ro/SSA protein. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 722-730.
27. Deutscher SL, Harley JB, Keene JD. Molecular analysis of the 60 Kd human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9.479-9.483.
28. Adam SA, Nakagawa T, Swanson MS, Woodruff TK, Dreyfuss G. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2.932-2.943.
29. Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60 Kd component of the human SSA/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1989; 83: 1.284-1.292.
30. Lieu TS, Newkirk MM, Capra JD, Sontheimer RD. Molecular characterization of human Ro/SSA antigen. *J Clin Invest* 1988; 82: 96-101.
31. Keene JD. Molecular structure of the La and Ro autoantigens and their use in autoimmune diagnostics. *J Autoimmune* 1989; 2: 329-334.
32. McCauliffe DP, Lux FA, Lieu TS, Sanz I, Hanke J, Newkirk MM et al. Molecular cloning, expression and chromosome 19 localization of a human Ro/SSA autoantigen. *J Clin Invest* 1990; 85: 1.379-1.391.
33. McCauliffe DP, Zappi E, Lieu TS, Michalak M, Sontheimer RD, Capra JD. A human Ro/SSA autoantigen is the homologue of Caireticulin and is highly homologous with Onchocercal RAL-1 antigen and an Aplysia "Memory molecule". *J Clin Invest* 1990; 86: 332-335.
34. Lux FA, McCauliffe DP, Buttner DW, Lucins R, Capra JD, Sontheimer RD et al. Serological cross-reactivity between a human Ro/SSA autoantigen and the λ RAL-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J Clin Invest* 1992; 89: 1.945-1.951.
35. Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan FK, Tan EM. A 52 Kd protein is a novel component of the SSA/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; 167: 1.560-1.571.
36. Landschultz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine Zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; 240: 1.759-1.764.
37. James JA, Dickey WD, Fujisaku A, O'Brien CA, Dentscher SL, Keene JO et al. Antigenicity of a recombinant Ro/SSA fusion protein. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 102-106.
38. Mattioli M, Reichlin M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum* 1974; 17: 421-429.
39. Francoeur AM, Chan EKL, Garrels JI, Mathews MB. Characterization and purification of lupus antigen La, an RNA-Binding protein. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 586-590.
40. Stefano JE. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 1984; 36: 145-154.
41. Chan EKL, Francoeur AM, Tan EM. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SSB/La nuclear protein. *J Immunol* 1986; 136: 3.744-3.749.
42. Rauh AJ, Horning H, Luhrmann R. At least three distinct B cell epitopes reside in the C-terminal half of La protein as determined by a recombinant DNA approach. *Eur J Immunol* 1988; 18: 2.049-2.057.
43. Whittingham S, Naselli G, McNeilage LJ. Autoepitopes reactive with anti-SSB/La. *J Autoimmun* 1989; 2: 345-351.
44. Chan EKL, Sullivan KF, Fox RI, Tan EM. Sjogren's syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes. *J Autoimmun* 1989; 2: 321-327.

45. Chan EKL, Tan EM. The small nuclear ribonucleoprotein SSB/La binds RNA with a conserved protease-resistant domain of 28 Kilodaltons. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2.588-2.591.
46. Mathews MB, Francoeur AM. La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylylate tail of a small RNA. *Mol Cell Biol* 1984; 4: 1.134-1.140.
47. Kohsaka H, Yamamoto K, Fujii H, Miyasaka N, Miura H, Tanaka Y et al. Molecular cloning of cDNA expressing SSB/La protein. *J Autoimmun* 1989; 2: 353-357.
48. Rodríguez Sánchez JL, Gelpi C. Aspectos moleculares de los anticuerpos antinucleares y su significación diagnóstica. 2.º seminario de inmunología avanzada. Hondarribia, 1985: 47-76.
49. McNeilage LJ, Whittingham S, Jack I, MacKay R. Molecular analysis of the RNA and protein components recognized by anti-SSB/La autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 685-695.
50. Fox RI, Pearson G, Vaughan JH. Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1986; 136: 3.162-3.168.
51. Baboonian C, Venables PJW, Booth J, Williams DG, Roffe LM, Maini RN. Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La(SSB): a possible mechanism for autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 454-459.
52. Chambers JC, Keene JD. Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus La antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2.115-2.119.
53. Sturgess AD, Peterson MG, McNeilage LJ, Whittingham S, Coppel RL. Characteristics and epitope mapping of a cloned human autoantigen La. *J Immunol* 1988; 140: 3.212-3.218.
54. St Clair EW, Pisetsky DS, Reich CF, Keene JD. Analysis of autoantibody binding to different regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1988; 141: 4.173-4.180.
55. St Clair EW, Pisetsky DS, Reich CF, Chambers JC, Keene JD. Quantitative immunoassay of anti-La antibodies using purified recombinant La antigen. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 506-514.
56. McNeilage LJ, Umapathysivam K, Macmillan E, Guidolin A, Whittingham S, Gordon TP. Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the La/SSB ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1992; 89: 1.652-1.656.
57. St Clair EW, Talal N, Moutsopoulos HM, Ballester A, Zerva L, Keene JD, Pisetsky DS. Epitope specificity of anti-La antibodies form patients with Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 1989; 2: 335-344.
58. Gordon TP, Greer M, Reynolds P, Guidolin A, McNeilage LJ. Estimation of amounts of anti-La(SSB) antibody directed against immunodominant epitope of the La (SSB) autoantigen. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 402-406.
59. Holman HR, Detcher HRG, Kunkel HG. L.E. cell and L.E. serum factors. *Bull NY Acad Med* 1959; 35: 409-418.
60. Tan EM, Kunkel HG. Characteristic of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1966; 96: 464-471.
61. Mattioli M, Reichlin M. Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. *J Immunol* 1971; 107: 1.281-1.290.
62. Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 311-335.
63. Busch H, Reddy R, Rothblum L, Choy YC. SnRNAs, snRNPs, and RNA processing. *Ann Rev Biochem* 1982; 51: 617-654.
64. Rodríguez Sánchez JL. Anticuerpos Antinucleares. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 1986.
65. Lerner EA, Lerner MR, Hardin JA, Janeway CA, Steitz JA. Deciphering the mysteries of RNA-containing lupus antigens. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 761-766.
66. Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 1987; 23: 766-771.
67. Habets WJ, Berden HM, Hoch SO, Van Venrooij WJ. Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 ribonucleoprotein antigens. *Eur J Immunol* 1985; 15: 992-997.
68. Conner GE, Nelson D, Wisniewolsky R, Lahita RG, Blobel G, Kunkel HG. Protein antigens of the RNA-protein complexes detected by anti-Sm and anti-RNP antibodies found in serum of patients with systemic lupus erythematosus and related disorders. *J Exp Med* 1982; 156: 1.475-1.485.
69. Habets WJ, De Rooij DJ, Salden MH, Verhagen AP, Van Eekelen CA, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ. Antibodies against distinct nuclear matrix proteins are characteristic for mixed connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 265-276.
70. Rokeach LA, Jannatipour M, Haselby JA, Hoch SO. Primary structure of a human small nuclear ribonucleoprotein polypeptide as deduced by cDNA analysis. *J Biol Chem* 1989; 264: 5.024-5.030.
71. Ohosone Y, Mimori T, Griffith A, Akizuki M, Homma M, Craft J, Hardin JA. Molecular cloning of cDNA encoding Sm autoantigen: derivation of a cDNA for a B polypeptide of the U series of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4.249-4.253.
72. Sharpe NG, Williams DG, Howarth DN, Coles B, Latchman DS. Isolation of cDNA clones encoding the human Sm B'/B autoimmune antigen and specifically reacting with human anti-Sm autoimmune sera. *FEBS Lett* 1989; 250: 585-590.
73. Rokeach LA, Haselby JA, Hoch SO. Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4.832-4.836.
74. Stanford DR, Kehl M, Perry CA, Holicky L, Harvey SE, Rohleder AM et al. The complete primary structure of the human snRNP E protein. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 10.593-10.605.
75. Wieben ED, Rohleder AM, Nenniger JA, Pederson T. cDNA cloning of a human autoimmune nuclear ribonucleoprotein antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7.914-7.918.
76. Elkon KB, Bonfa E, Llovet R, Eisenberg RA. Association between anti-Sm and anti-ribosomal P protein autoantibodies in human systemic lupus erythematosus and MRL/lpr mice. *J Immunol* 1989; 143: 1.549-1.554.
77. Yamamoto K, Miura H, Moro Y et al. Isolation and characterization of a complementary DNA expressing human U1 small nuclear ribonucleoprotein C polypeptide. *J Immunol* 1988; 6: 3.841-3.848.
78. Sillekens PTG, Habets WJ, Beijer RP, Venrooij WJ. cDNA cloning of the human U1 snRNA-associated A

- protein: extensive homology between U1 and U2 snRNP-specific proteins. *EMBO J* 1987; 6: 3.841-3.848.
79. Reuter F, Lehner CF, Nigg EA, Luhrmann R. A monoclonal antibody specific for snRNPs U1 and U2. *FEBS Lett* 1986; 201: 25-30.
80. Theissen H, Etzerodt M, Reuter R, Schneider C, Lottspeich F, Argos P et al. Cloning of the human cDNA for the U1 RNA-associated 70 Kd protein. *EMBO J* 1986; 5: 3.209-3.217.
81. Query CC, Bentley RC, Keene JD. A common RNA recognition motif identified within a define U1 RNA binding domain of the 70 Kd U1 snRNP protein. *Cell* 1989; 57: 89-101.
82. Habets WJA, Hoet MH, Sillekens PTG, De Rooij AM, Van de Putte LBA, Van Venrooij WJ. Detection of autoantibodies in a quantitative immunoassay using recombinant ribonucleoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 172-177.
83. Seelig HP, Ehrfeld H, Schroeter H, Heim C, Renz M. A recombinant 70 Kd ELISA. *J Immunol Methods* 1991; 143: 11-24.
84. Garcia Lerma JG, Zea A, Ramos MJ, Sequi J. Diagnostic utility of recombinant SSA/Ro, SSB/La, Sm and U1 RNP autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Actas International Symposium "The impact of biotechnology on autoimmunity"*. BIOTEC 1993; 8: 120.

Evaluation of Recombinant Ro/SSA, La/SSB, Sm, and U1 RNP Autoantigens in Clinical Diagnosis

José Gerardo García Lerma,¹ Antonio Zea Mendoza,² María Jesús Ramos,¹ and Julia Sequí¹

¹Department of Immunology, Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva, Instituto Carlos III. Sinesio Delgado 10, Madrid, Spain; ²Department of Rheumatology, Hospital Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar Km. 9.100, Madrid, Spain

This study comprises an analysis of the diagnostic usefulness of Ro/SSA, La/SSB, Sm and U1 RNP autoantigens obtained by DNA recombinant technology. We studied the presence of these autoantibodies in 33 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and 30 normal individuals by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant autoantigens and by Western immunoblot with these same antigens obtained from natural sources (rabbit thymus and human spleen). The strength of agreement between results found with these two techniques was moderate in the case of anti-Ro/SSA ($\kappa = 0.474$, $P < 0.001$) and anti-U1 RNP ($\kappa = 0.566$, $P < 0.001$) antibodies and almost perfect in the case of anti-La/SSB ($\kappa = 0.871$, $P < 0.001$) and anti-Sm ($\kappa = 0.833$, $P < 0.001$). Furthermore, analysis of the dis-

agreement between the two techniques evidenced a measurement bias for anti-Ro/SSA and anti-U1 RNP antibodies (Mc NEMAR'S statistic 13 and 11, respectively) whose direction, though difficult to define in the absence of a gold standard for such determinations, could be accounted for by the ELISA technique's greater tendency to produce positive results. Our conclusion is that the diagnostic usefulness of recombinant La/SSB and Sm autoantigens has been satisfactorily proven, whereas the case of the Ro/SSA and U1 RNP systems should be subject to further in-depth study of the autoepitopes recognised and the possible modifications which the latter might undergo as a result of their obtention from procarciotic sources. © 1995 Wiley-Liss, Inc.

Key words: recombinant autoantigens, systemic lupus erythematosus

INTRODUCTION

Serum from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) frequently contains antibodies directed against a wide range of self-antigens (1), including highly conserved ribonucleoprotein particles such as Ro/SSA (52-, 54-, and 60-kd polypeptides), La/SSB (48-kd phosphoprotein) and snRNP recognised by anti-Sm antibodies (B/B, D, E, F and G polypeptides) and anti-U1 RNP (A-, C-, and 70-kd polypeptide associated to this particle) (2). Analysis of this antibody response is of great value in reaching a firm diagnosis of SLE and it is even widely accepted that the presence of certain autoantibodies provides markers for a given autoimmune pathology and/or is of prognostic interest (1,3), hence the inclusion of the presence of anti-Sm antibodies among the criteria published by the American College of Rheumatology for the diagnosis of this disease (4), and the recognition that patients with high titers of anti-DNA antibodies are at increased risk of suffering lupic glomerulonephritis (5). All these factors point to the need for laboratory techniques which permit the detection of these autoantibodies with the maximum reliability. A wide variety of techniques are now in use, giving rise

to a situation where different laboratories using different methods all too often obtain differing results for the same patient (6).

One of the major problems in developing an autoantibody detection technique is the difficulty of obtaining pure antigens in sufficient quantity to be detectable by sera. As such antigens are normally present in human and animal tissue at low concentrations (7-9), requiring a costly and laborious purification process, the existence of a source from which they can be extracted in sufficient quantity with the maximum degree of purity would represent an important step forward in the development of detection techniques (10). Researchers are currently seeking a way round this limitation through the application of autoantigen-cloning technologies.

Modern biotechnology has permitted the cloning of the main autoantigen genes and their obtention as fusion proteins with the aim of developing ELISA techniques for autoanti-

Received May 2, 1994; accepted June 21, 1994.

Address reprint requests to José Gerardo García Lerma, Department of Immunology, Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva, Instituto Carlos III. Sinesio Delgado 10, 28029 Madrid (Spain).

body detection (10). Although this process is not exempt from problems, arising mainly from the conformational changes to which autoantigens are exposed when they stick to the bottom of the wells (11), it allows the simultaneous analysis of a large number of samples with only a small quantity of antigen, providing substantial cost and time savings, together with enhanced detection sensitivity.

The development of these diagnostic techniques required a prior in-depth analysis of the autoantigens with regard to sequence and structural characteristics (12–17). These efforts led to the identification of linear and conformational antigenic determinants (18,19); in some cases, it has been possible to draw up complete maps of the epitopes recognised (20).

In this study, we analyze the diagnosis reliability of an ELISA technique employing recombinant Ro/SSA, La/SSB, Sm, and U1 RNP autoantigens in order to determine whether this technology can provide a better definition of the specificities recognized by autoimmune sera.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

Patients with SLE (n=33) were drawn from the Rheumatology Service of Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain) and met at least four of the revised criteria of the American College of Rheumatology for the classification of SLE (4). Sera were selected on the basis of the presence or otherwise of recognition patterns in Western immunoblot and, as such, did not constitute a randomized sample.

Serum samples with anti-Ro/SSA, La/SSB, Sm, and U1 RNP antibodies confirmed by Counterimmunoelectrophoresis and Western immunoblot were obtained from Hospital Ramón y Cajal. Normal control sera (n=30) were obtained from healthy young adults.

Antigenic Extracts

Rabbit thymus extract (Pel-Freez, Arkansas)

This extract was prepared essentially as described by Kurata and Tan (21). Briefly, 2 g of rabbit thymus powder was mixed overnight with 20 ml of PBS, 1 mM PMSF at 4°C. The mixture was centrifuged for 40 min at 1,800g and the supernatant was aliquoted and frozen at -20°C.

Human spleen

Partially purified Ro/SSA antigen from human spleen was prepared according to the method of Clark et al. (22) with some modifications. Briefly, the trimmed spleen was homogenized in two volumes of PBS, 0.1 mM PMSF. After centrifugation at 33,000g for 30 min, the supernatant was kept at 4°C overnight and later centrifuged again at 15,000g for 10 min. This supernatant was applied to a Macro-Prep 50 Q an-

ionic exchange column (Bio-Rad, Richmond, CA). For the elution of Ro/SSA antigen, 0.1 phosphate buffer, 0.5 M NaCl was added and the subsequent fraction was dialyzed overnight against PBS.

Detection of Autoantibody Specificities by Western Blotting

Rabbit thymus extract (0.4 mg) or 0.25 mg of partially purified Ro/SSA was applied across the full width of a 12% (w/v) polyacrylamide–sodium dodecyl sulfate (SDS) gel and electrophoresis was performed according to Laemmli (23). Blotting to nitrocellulose sheets was carried out for 1 hr at 5.5 mA/cm² in carbonate buffer as reported (24), but 20% ethanol was added instead of methanol (25). Nonspecific sites were blocked for 1 hr with 0.1 M Tris pH 7.2, 0.9% NaCl, 3% bovine serum albumin (BSA), 0.1% Tween-20 (TBS-BSA-T), and the strips were incubated overnight with either normal control (1:50) or SLE serum samples (1:100) diluted in the same solution. The blots were rinsed three times with TBS-BSA-T and incubated for 1 hr with an alkaline phosphatase monoclonal antihuman IgG (Fc) (Clone MK1AG, The Binding Site, Birmingham, UK), diluted 1:8,000 in TBS-BSA-T. After three washes with TBS-BSA-T and one with distilled water, antigen bound antibody specificities were visualized with nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) (Bio-Rad, Richmond, CA).

ELISA

Detection of antibodies to Ro/SSA, La/SSB, Sm, and U1 RNP followed the recommended procedures set out by the manufacturer (RheumELISA System, Boehringer Ingelheim, Walkersville, MD). In all assays, positive controls exceeded the minimum requirements for validation (RNP > 1.5; Sm > 1.4; Ro/SSA > 1.1; La/SSB > 1.2) while negative controls at no time exceeded 0.2 units of Optical Density (OD). The ELISA reader (SLT Instruments) used a program that determines the positivity or negativity of sera by the negative control value and positivity cut-off recommended by the manufacturer.

Statistical Analysis

The results of both techniques were analyzed by the calculation of κ statistics, which determine strength of agreement between different measurements. κ values were then interpreted in line with the recommendations of Landis and Koch (26): $\kappa = 0-0.20$, slight concordance; 0.21–0.40, fair; 0.41–0.60, moderate; 0.61–0.80, substantial; and 0.81–1.00, almost perfect. Mc NEMAR'S statistic was used to determine the presence or otherwise of result bias, with values over 3.8 taken as unacceptable bias in biological determinations.

RESULTS

Results Obtained by ELISA With Recombinant Autoantigens

In the serum population corresponding to SLE patients, 61% showed positive for Ro/SSA, 27% for La/SSB, 45% for Sm, and 64% for U1 RNP. The high percentage of positive results is accounted for by the nonrandomized nature of SLE sera selection. On the other hand, in the normal sera population 7% showed positive for Ro/SSA, 3% for La/SSB, and 3% for U1 RNP.

Results Obtained by Western Blotting

Known specificity controls on the rabbit thymus extract revealed the presence of La/SSB antigens, B'/B and D Sm polypeptides, 70-kd and C polypeptides reactive with anti-U1 RNP sera, and P0, P1, and P2 ribosomal phosphoproteins (27) which are not included in the present analysis as they were not present in the ELISA. The 60- and 52-kd proteins known as Ro/SSA were detected in the human spleen extract. The WB results in the serum population corresponding to SLE patients are shown in Figures 1 and 2. As expected, in the normal control sera population no reactivity was found to any protein in the rabbit thymus extract (Fig. 3). In the human spleen extract, three normal sera recognized some polypeptide other than Ro/SSA (Fig. 4).

Strength of Agreement Between Western Blot and ELISA Results With Recombinant Autoantigens

In the case of Ro/SSA and U1 RNP autoantigens, the strength of agreement between the two techniques was mod-

erate ($\kappa = 0.474$, $P < 0.001$ and $\kappa = 0.566$, $P < 0.001$, respectively, Table 1). Result disagreement corresponded to sera showing positive in the ELISA assay and negative by WB (Table 2).

For the La/SSB antigen, the strength of agreement was almost perfect ($\kappa = 0.871$, $P < 0.001$, Table 1), with only one SLE serum and one normal serum showing positive by ELISA and negative by WB (Table 2).

In the case of the Sm antigen, the strength of agreement is again almost perfect ($\kappa = 0.833$, $P < 0.001$, Table 1), with result disagreement corresponding to 4 SLE sera: three negative by ELISA and positive by WB and one positive by ELISA and negative by WB (Table 2).

DISCUSSION

Analysis of the response directed against self-antigens in patients with autoimmune manifestations can furnish useful information for diagnosis. For this reason, detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence (IF) or similar assays is one of the 11 criteria accepted by the American Rheumatism Association (ARA) for the diagnosis of SLE (4).

One characteristic of autoimmune sera that makes their study more difficult is their polyclonality and the resulting possibility of recognizing different antigenic determinants in a single autoantigen. This can give rise to different immunoassays detecting subpopulations of total antibody response to a given antigen whose reactivity may differ both qualitatively and quantitatively. Thus, each assay has a set of defining characteristics that permit the detection of certain specific subpopulations and

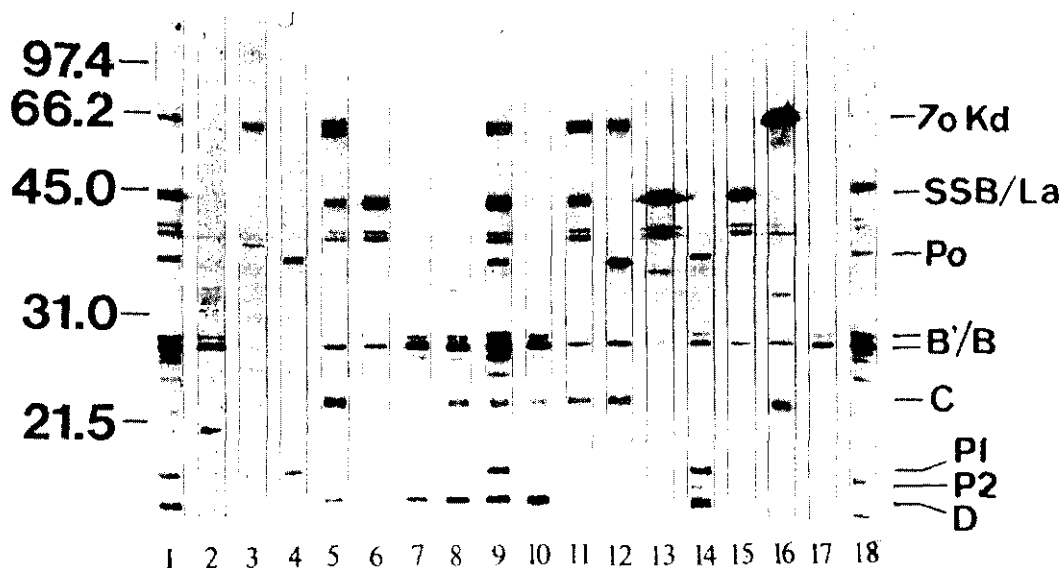


Fig. 1. Sera of SLE patients in Western blot with rabbit thymus saline extract. Lanes 1, 9, 18, mixture of positive control sera with antibodies directed against La/SSB, B'/B, D, C, 70 kd and P0, P1, and P2 ribosomal phosphoproteins. The remaining lanes are sera of SLE patients.

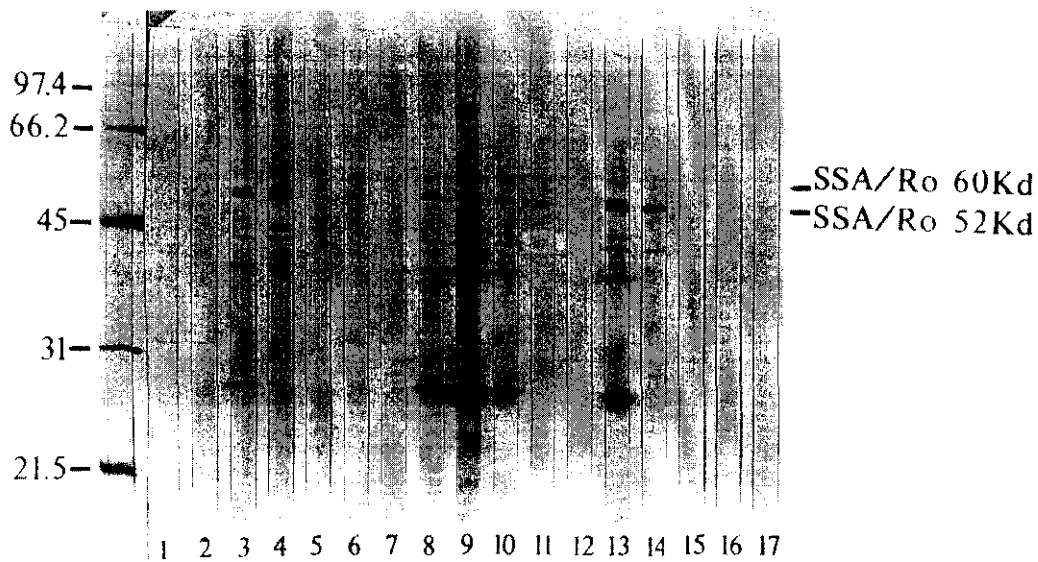


Fig. 2. Sera of SLE patients in Western blot with human spleen extract. Lane 1, negative control; lanes 3, 4, 9, are Ro/SSA-positive control sera and reveal the presence of 60- and 52-kd Ro/SSA polypeptides; Lanes 2, 5,

control sera with anti-La/SSB (lane 2) and anti-La/SSB and anti-Ro/SSA (lane 5) antibodies by counterimmunoelectrophoresis, but negatives or weakly positives by this assay. The remaining lanes are sera of SLE patients.

not others. IF can be used for a preliminary study of sera but is incapable of providing essential information regarding the molecular nature of the autoantigens recognized. Double immunodiffusion and counterimmunoelectrophoresis offer good specificity but with reduced sensitivity. With Western blotting, the possibility of defining conformational antigenic determinants is poor. On the other hand, this technique offers repetitivity of linear epitopes, giving enhanced sensitivity. Immunoprecipitation

is effective in detecting conformational epitopes, but its complexity and expense reduce its value in analyzing the autoimmune response.

In short, determination of the specificities recognized by autoimmune sera by means of these techniques is all too frequently problematic (6). Obviously, for diagnostic purposes, it is not possible to study the same serum using different techniques, due mainly to problems of time and cost.

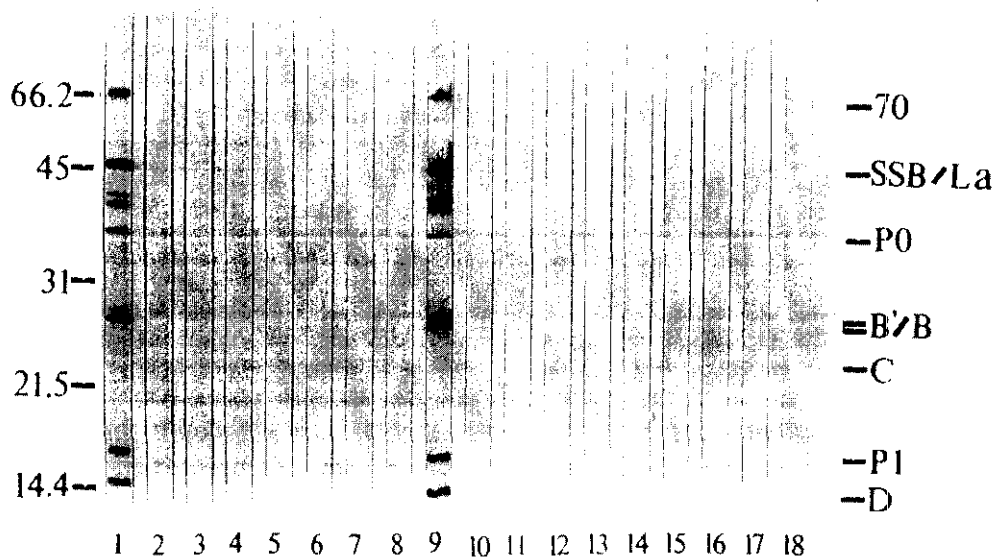


Fig. 3. Normal control sera in Western blot with rabbit thymus saline extract. Lanes 1, 9, mixture of positive control sera with antibodies directed against La/SSB, B/B, D, C, and 70-kd and P0, P1, and P2 ribosomal phosphoproteins. The remaining lanes are normal control sera.

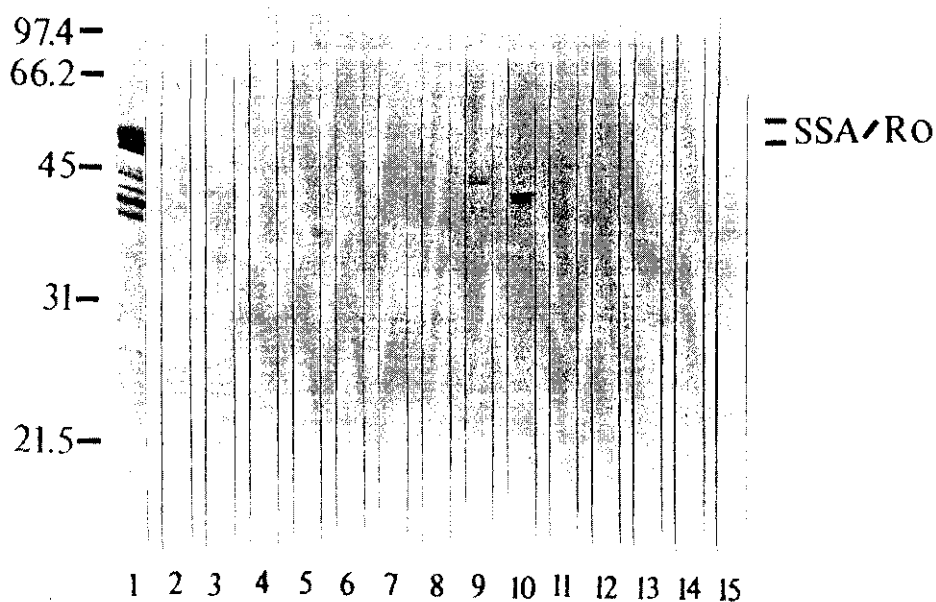


Fig. 4. Normal control sera in human spleen extract. Lane 1, Ro/SSA positive control. The remaining lanes are normal control sera.

In our study, we analyzed the diagnostic reliability of an ELISA technique employing Ro/SSA, La/SSB, Sm, and U1 RNP autoantigens obtained by DNA recombinant technology, in order to determine whether this technology can provide a better definition of the specificities recognized by autoimmune sera. Results obtained with this technique were compared with those afforded by WB using rabbit thymus and human spleen extracts as antigenic sources.

Despite dissimilarities between both techniques, WB was chosen for the following reasons: (1) both assays are highly sensitive, and (2) the application of WB with the above antigenic sources does not require costly and laborious purification processes and, as such, offers a practical alternative for serological diagnosis.

In the case of the La/SSB antigen, the results obtained show almost perfect agreement between WB and ELISA with recombinant autoantigens ($\kappa = 0.871$, $P < 0.001$, Table 1). Only the serum of a single patient with SLE showed ELISA-positive and WB-negative (Table 2), and positivity could stem from the preferential recognition of highly conformational

antigenic determinants detected by ELISA, but not by WB (18). Nevertheless, OD readings in the ELISA are not very high (data not shown) and, as such, the positive result referred to could be due to greater detection sensitivity. In the normal population, all sera except one showed negative in both assays (Table 2). As is the case with SLE sera, positivity in this healthy subject was shown only by ELISA. Probably, either the serum in question had low autoantibody titres, as previously reported in the normal population (28), or the result was a false-positive. However, these data could lead us to believe that the only difference between the two techniques lies in the greater sensitivity of ELISA with La/SSB obtained by recombinant technology.

Results for the Ro/SSA antigen are less homogeneous than those found for La/SSB, with strength of agreement within the moderate range ($\kappa = 0.474$, $P < 0.001$, Table 1). In the SLE patient population, result disagreement corresponded in its entirety to sera-positive by ELISA and negative by WB (Table 2). This could be due to a series of factors. First, only 60- and 52-kd Ro/SSA proteins appear in WB and the 54-kd polypeptide is not present; thus, 54-kd-monospecific proteins would give negative results with this technique. Second, in a similar fashion, it is feasible that the obtention of Ro/SSA as a fusion protein in prokaryotic systems could lead to the appearance of highly nonspecific antigenic determinants for a subpopulation of SLE sera. Third, recently, some sera with anti-Ro/SSA activity have been found which fail to recognise this antigen in denaturalizing techniques like WB (19), postulating the existence of a subpopulation of sera with anti-Ro/SSA activity that recognize conformational epitopes. It is

TABLE 1. Strength of Agreement Between ELISA and Western Blot Results

Autoantigen	κ	Strength of Agreement
SSA/Ro ^a	0.474 ($P < 0.001$)	Moderate
U1RNP ^a	0.566 ($P < 0.001$)	Moderate
Sm	0.833 ($P < 0.001$)	Almost perfect
SSB/La	0.871 ($P < 0.001$)	Almost perfect

^aMc NEMAR statistic > 3.8

TABLE 2. Results Obtained by ELISA With Recombinant Autoantigens and Western Blot in SLE Patients and Normal Controls

	La/SSB				Ro/SSA				Sm				U1 RNP			
	+/+ ^a	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
SLE	8	1	0	24	9	11	0	13	14	1	3	15	11	10	0	12
Normal controls	0	1	0	29	0	2	0	28	0	0	0	30	0	1	0	29

^aELISA result/Western blot result.

just possible that these conformational determinants are maintained in the ELISA, although any such assertion is challenged by the fact that antigen conformation is also modified in this technology.

Nevertheless, the appearance of two normal sera showing positive by ELISA and negative by WB leads us to believe that the main problem arising from the use of Ro/SSA obtained by recombinant technology is the lack of specificity in the detection of these autoantibodies.

For the Sm antigen, the agreement between the two techniques was almost perfect ($\kappa = 0.833$, $P < 0.001$, Table 1), with three sera corresponding to SLE patients showing negative by ELISA and positive by WB and one other showing WB-negative and ELISA-positive (Table 2). In this case, the result disagreement corresponds mainly to ELISA-negative sera. One possibility is that the obtention of this antigen from procariotic sources might involve the disappearance of linear epitopes, given that these sera do recognise Sm in WB. On the other hand, one serum showed positive by ELISA and negative by WB. Although reactivity to E, F, and G Sm polypeptides has been reported as occurring in a small percentage of sera (29), if we assume that the serum in question recognized one of these monospecifically, its detection would be beyond the scope of WB, in which these polypeptides are not represented. In the normal population, 100% of sera were negative by both techniques, demonstrating specificity which would logically be expected in the recognition of an SLE-specific autoantigen. However, as the presence of anti-Sm antibodies is a diagnostic criterion for SLE, the existence of sera showing negative by ELISA and positive by WB shows that there is a certain proportion of sera whose positivity is not identified by the use of the Sm recombinant autoantigen.

In the case of the U1 RNP antigen, agreement between results is moderate ($K = 0.566$, $P < 0.001$, Table 1). All result disagreement corresponded to sera showing positive by ELISA and negative by WB (Table 2). As far as the SLE sera are concerned, one possible explanation is the nonrepresentation of the A polypeptide of the U1 RNP particle and the resulting failure of WB to detect A polypeptide-monospecific sera. However, in studies carried out in large populations of SLE patients, no sera of this type have been identified (30).

It seems more logical to attribute this lack of correlation either to the appearance of additional antigenic determinants in the recombinant autoantigen or the fact that the latter was

insufficiently pure. However, the normal population showed acceptable results and these problems are apparently restricted to the SLE sera.

It can therefore be asserted that the diagnostic usefulness of the La/SSB and Sm systems is satisfactory, while the case of the Ro/SSA and U1 RNP autoantigens requires more in-depth study on both the epitopes recognized by sera and the possible modifications that these might undergo as a result of their obtention from procariotic sources.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Carmen Vela, Dr. I. Moneo, and Dr. M. González Muñoz for technical assistance. This work was supported in part by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS, project 91/0112).

REFERENCES

1. Tan EM: Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44:93-141, 1989.
2. Fritzler JM, Salazar M: Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev* 4:256-269, 1991.
3. Tsokos GC, Pillemer SR, Klippel JH: Rheumatic disease syndromes associated with antibodies to the Ro/SSA ribonucleoprotein. *Semin Arthritis Rheum* 16:237-244, 1987.
4. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277, 1982.
5. Isenberg D, Shoenfeld Y: The origin and significance of anti-DNA antibodies. *Immunol Today* 8:279-282, 1987.
6. Sequí J: El taller Nacional de autoinmunidad 1989. *Inmunologia* 9:73-78, 1989.
7. Boire G, Craft J: Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. *J Clin Invest* 84:270-279, 1989.
8. Whittingham S, Naselli G, McNeilage LJ: Autoepitopes reactive with anti-SSB/La. *J Autoimmun* 2:345-351, 1989.
9. Francoeur AM, Chan KL, Garrels JI, Mathew MB: Characterization and purification of lupus antigen La, an RNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 5:586-590, 1985.
10. Paxton H, Bendele T, O'Connor L, Haynes DC: Evaluation of the RheumStrip profile test: A rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SSA/Ro, SSB/La, and to native DNA. *Clin Chem* 36:792-797, 1990.
11. Saitta MR, Keene JD: Molecular biology of nuclear autoantigens. *Rheumatic Dis Clin North Am* 18:283-310, 1992.
12. Deutscher SL, Harley JB, Keene JD: Molecular analysis of the 60 kD human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9479-9483, 1988.
13. Chambers JD, Keene JD: Isolation and analysis of cDNA clones ex-

- pressing human lupus La antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2115-2119, 1985.
14. Sillekens PT, Habets WJ, Beijer RP, Venrooij WJ: cDNA cloning of the human U1 snRNA-associated A protein: Extensive homology between U1 and U2 snRNP-specific proteins. *EMBO J* 6:3841-3848, 1987.
 15. Theissen H, Etzerodt M, Reuter R, et al: Cloning of the human cDNA for the U1 RNA-associated 70 Kd protein. *EMBO J* 5:3209-3217, 1986.
 16. McCauliffe DP, Lux FA, Lieu TS, et al.: Molecular cloning, expression and chromosome 19 localization of a human SSA/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 85:1379-1391, 1990.
 17. Chan KL, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM: Molecular definition and sequence motifs of the 52 kD component of human SSA/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 87:68-76, 1991.
 18. McNeilage LJ, Umapathysivam K, Macmillan E, Guidolin A, Whittingham S, Gordon T: Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the SSB/La ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 89:1652-1656, 1992.
 19. Boire G, Lopez Longo FJ, Lapointe S, Ménard HA: Sera from patients with autoimmune diseases recognize conformational determinants of the 60 Kd Ro/SSA protein. *Arthritis Rheum* 34:722-730, 1991.
 20. Williams DG: Recombinant autoantigens. *Ann Rheum Dis* 49:445-451, 1990.
 21. Kurata N, Tan EM: Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum* 19:574-580, 1976.
 22. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 102:117-122, 1969.
 23. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680, 1970.
 24. Dunn SD: Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Ann Biochem* 157:144, 1986.
 25. Van Dam AP, Van Den Brink HG, Smeenk RJT: Technical problems concerning the use of immunoblots for the detection of antinuclear antibodies. *J Immunol Methods* 129:63-70, 1990.
 26. Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174, 1977.
 27. Francoeur AM, Peebles CL, Heckman KJ, Lee JC, Tan EM: Identification of ribosomal protein autoantigens. *J Immunol* 135:2378-2384, 1985.
 28. Dighiero G, Guilbert B, Avrameas S: Natural occurring antibodies against nine common antigens in human sera. *J Immunol* 128:2788-2792, 1982.
 29. Ohosone Y, Mimori T, Griffith A, et al: Molecular cloning of cDNA encoding Sm autoantigen: Derivation of a cDNA for a B polypeptide of the U series of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4249-4253, 1989.
 30. Habets WJ, Berden HM, Hoch SO, Van Venrooij WJ: Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 ribonucleoprotein antigens. *Eur J Immunol* 15:992-997, 1985.

Comparison of the Anti-Laminin Antibody Response in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Parasitic Diseases (Filariasis)¹

J. G. GARCÍA LERMA, I. MONEO, M. ORTIZ DE LANDÁZURI,* AND J. SEQUÍ NAVARRO

Department of Immunology, Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; and *Department of Immunology, Hospital de la Princesa, 28006 Madrid, Spain

In this study, we analyzed the presence of antibodies against the basement membrane antigen laminin (LMN) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), filariasis, and normal controls. By ELISA, 13.8% of SLE (12/87), 66.7% of parasitized patients (20/30), and two of the normal controls had these antibodies. IgG1 anti-LMN response was elevated in all groups, whereas IgG2 and IgG3 were also elevated in parasitized patients. The analysis of the IgG anti-laminin binding capacity in SLE and parasitized patients showed similar average antibody affinity. These antibodies did not react with fibronectin by a competition ELISA. By Western blot, the anti-laminin antibodies could be demonstrated in parasitized patient sera but not in SLE sera. Moreover, the ability of these antibodies to bind to heat-treated LMN (100°C for 4 min) was different. The study of the binding capacity with native or denatured LMN by Western blot and dot-blot assays showed that the anti-LMN antibodies from parasitized patients were able to react with both native and denatured forms of LMN, whereas in SLE patients these antibodies were demonstrated only with native LMN. On the other hand, the reactivity detected in the normal control sera seems to be different from the anti-LMN antibodies from SLE and parasitized patients, and probably reflects the existence of natural antibodies in these sera. The presence of anti-LMN antibodies correlates significantly with the ability of inhibition of U937 cell adhesion to LMN-coated surfaces ($P < 0.0025$). The difference of anti-laminin reactivity suggests that antibodies produced following immunization with autoantigens or similar molecules present in parasites have different specificities from those spontaneously produced by individuals with autoimmune diseases. © 1995 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Laminin (LMN)² is the major glycoprotein in all basement membranes, the thin extracellular matrices (ECM) that underlie epithelial cells and endothelial cells and surround nerve, muscle, and fat cells. LMN consists of two different B chains (B1 and B2) of about the same size (230 and 220 kDa) and a larger A chain (400 kDa), which are assembled into a cross-shaped structure stabilized by disulfide bonds (1, 2). This glycoprotein was first isolated from the Engelbreth-Holm-Swarm tumor (EHS) because it can be readily extracted and purified in intact form under nonreducing and nondenaturing conditions. Isolation of LMN from normal tissues has been achieved in many cases only with denaturing and reducing agents and, consequently, most of the biochemical and immunological work has been performed with EHS LMN. This LMN exhibits an overall identity of 74% in G2 to G5 regions with human LMN and 90% in other parts of the molecule (1).

Numerous studies indicate that LMN has diverse biological activities which include stimulating adhesion, migration, growth, and differentiation of various cells (3-6). It binds cells through cell surface receptors (integrins and nonintegrin proteins) (7-10) and interacts with other components of basement membranes including collagen IV, heparan sulfate proteoglycan, and nidogen/entactin.

The presence of antibodies directed to ECM components (collagens, fibronectin, proteoglycans, and basement membrane components) has been described in some autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (11). Serum antibodies against EHS LMN have been detected in patients with progressive systemic sclerosis, Raynaud's phenomena, and MRL-*lpr*-mice, a strain that develops a spontaneous arthritis displaying articular and extraarticular features similar to those of rheumatoid arthritis in humans (11-13). However, these autoantibodies have not been previously detected in human systemic lupus erythematosus (SLE) and vasculitis (14). In addition, antibodies to mouse LMN

¹ This paper was supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias FISS 91/0112.

² Abbreviations used: LMN, laminin; SLE, systemic lupus erythematosus; EHS LMN; Engelbreth-Holm-Swarm; ECM, extracellular matrix.

have been detected in patients with American cutaneous leishmaniasis and Chagas' disease (15). Previous studies have indicated that these antibodies recognize on the basement membrane antigen a terminal galactosyl (α 1-3)-galactose group (15-17).

In this study we analyzed the immune response directed against this glycoprotein in two different but related situations: autoimmune diseases (SLE) characterized by the recognition of self-molecules (18) and parasitic diseases (filariasis) where the possibility of cross-reactivity with autoantigens is supported by the presence of molecules similar to self-components (19).

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

Sera of patients with filariasis ($n = 30$) were obtained from individuals infected by *O. volvulus* ($n = 6$), *M. perstans* ($n = 15$), *Loa loa* ($n = 3$), *O. volvulus* and *M. perstans* ($n = 4$), *M. perstans* and *Loa loa* ($n = 1$) and *O. volvulus*, *M. perstans* and *M. streptocerca* ($n = 1$) and were kindly given by Dr. Puente (Servicio de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigación Clínica, I. Carlos III, Madrid). Sera of patients with SLE ($n = 87$) were kindly given by Dr. Zea (Rheumatology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid). Thirty control serum samples of normal Spanish population were obtained from healthy volunteers.

ELISA

The purity of EHS mouse sarcoma LMN preparation (Boehringer Mannheim, GmbH, West Germany) was checked by Coomassie blue staining of a SDS-polyacrylamide gel (not shown). LMN showed bands corresponding to published molecular weight (20). For ELISA assay, LMN (5 μ g/ml) was coated for 2 hr at 37°C in 96-well ELISA plates (Polysorp, Nunc). After washing, the nonsaturated binding sites were blocked for 1 hr at room temperature with 3% BSA-10 mM Tris-0.9% NaCl (TBS-3% BSA) followed by sequential washes. Sera diluted 1/50 in TBS-1% BSA-0.05% Tween 20 were applied to wells in duplicate and incubated overnight at 4°C. After washing, the plates were incubated with an alkaline phosphatase goat anti-human IgG antibody (1/4000, Tago Burlingame, CA), or monoclonal anti-human IgG1 (1/250, clone 8c/6-39), IgG2 (1/500, clone HP6014), IgG3 (1/2000, clone HP6050), and IgG4 (1/250, clone HP6023) (The Binding Site, Birmingham, UK) in serum buffer for 1 hr at 37°C. The plates were washed again and developed by adding *p*-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO).

Quantitative determination of total IgG levels in anti-LMN positive sera was made by rate nephelometry (Beckman Instruments, Galway, Ireland). Levels of anti-LMN IgG or immunoglobulin subclasses were

compared using Student's two-tailed *t* or Mann-Whitney *U* tests. Spearman rank correlation coefficient was used for comparison between different binding curves.

Protein G-Sepharose Fractionation

The following IgG fractions were obtained: individual ELISA-positive sera (SLE, parasitized patient, and normal control sera), and pooled sera from anti-LMN-positive SLE, anti-LMN-positive parasitized patients, and anti-LMN-negative normal controls. The samples were diluted in binding buffer and passed through a column of protein G-Sepharose equilibrated in the same buffer (Pierce, Rockford, IL). The eluted IgG, neutralized with 0.15 M phosphate buffer, was desalted and buffer exchanged by passing through an cellulose GF-5 desalting column equilibrated in PBS (Pierce). The protein concentration of the IgG fraction was determined by bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce).

Competition Assay

Purified IgG fractions from pooled sera from SLE or parasitized patients adjusted to the same anti-LMN activity ($OD_{405\text{ nm}}$) were preincubated overnight at 4°C with variable concentrations of native LMN, heat-treated LMN (100°C for 4 min), and fibronectin (Sigma Chemical Co.). The mixture was reacted against LMN on ELISA as described above. The results were given as percentage of inhibition (11). In competition assay with fibronectin, the mixture was centrifuged at 5000g for 10 min and then added to LMN-coated wells.

Immunoblot Analysis

For Western blot assay, 100 μ g of LMN was applied across the full width of a 6% SDS-polyacrylamide gel and electrophoresis was performed according to Laemmli (21). Blotting was made to nitrocellulose sheets for 45 min at 5.5 mA/cm² in Towbin buffer (22). Nonspecific sites were blocked for 1 hr with 0.1 M Tris, 0.9% NaCl, 3% BSA (TBS-3% BSA), and the strips were incubated overnight with an affinity-purified rabbit anti-EHS LMN antibody diluted 1/16,000 (Sigma), pooled anti-LMN-positive or -negative sera, or serum samples diluted 1/50 in TBS-1% BSA. The blots were rinsed three times and incubated for 1 hr with either an alkaline phosphatase monoclonal anti-human IgG (Fc) (Clone MK1AG, The Binding Site) diluted 1:8000 or a goat anti-rabbit Ig diluted 1/20,000 (Tago). After three washes, antigen-bound antibody specificities were visualized with nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Bio-Rad, Richmond, CA).

For the dot-blot assay, 4 μ l of LMN at different concentrations (200, 100, 50, and 25 μ g/ml), and under

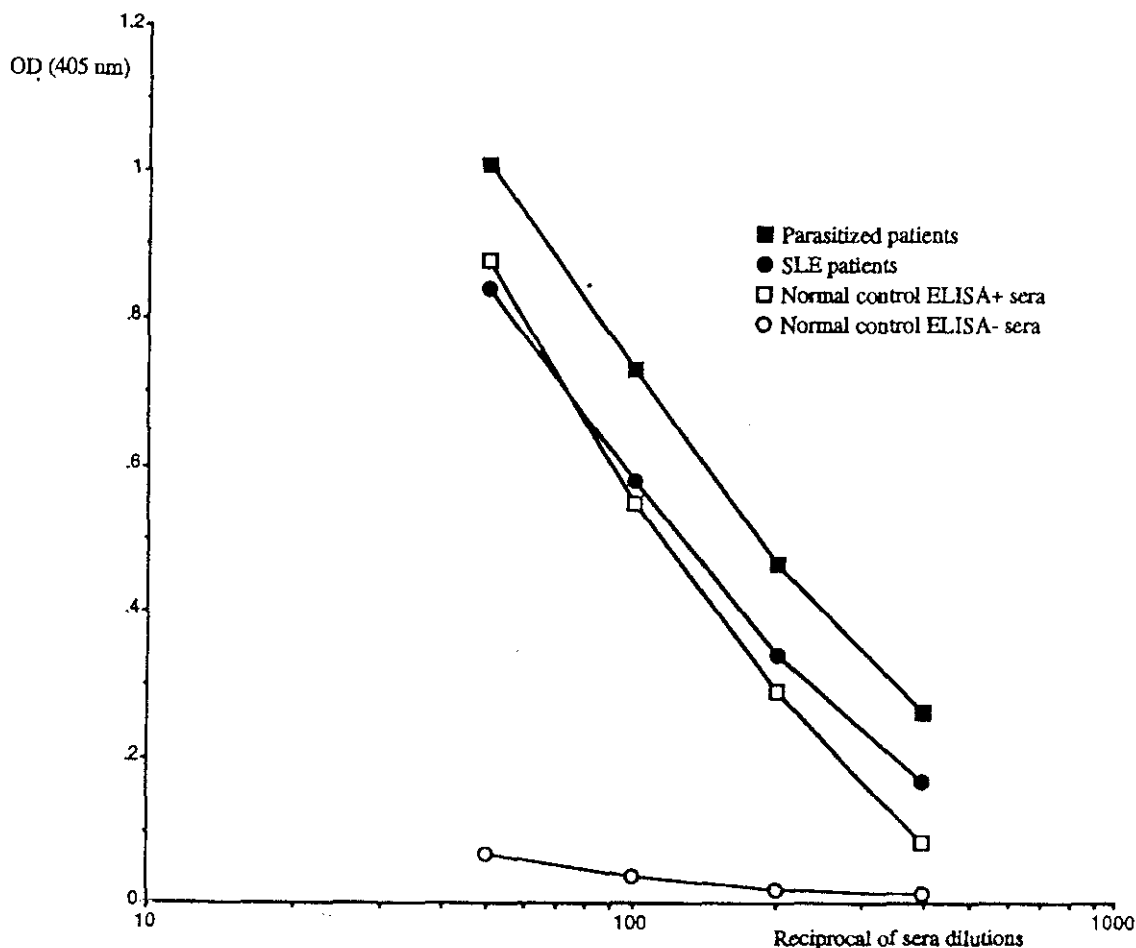


FIG. 1. Antibodies against EHS LMN. Data indicate mean of OD values obtained in parasitized patients ($n = 19$), SLE ($n = 12$), normal control ELISA-positive sera ($n = 2$), and normal control ELISA-negative sera ($n = 8$).

varying conditions of naturation (native, 100° for 4 min, 1% SDS/10% β -mercaptoethanol or 1% SDS), was applied to nitrocellulose membranes and allowed to dry. After blocking with TBS-3% BSA, the protocol was the same as above.

For the LMN renaturation the gel was incubated for 1 hr with 50 mM Tris-20% glycerol, pH 7.4, before the transference to nitrocellulose membrane (23), or the

nitrocellulose was incubated for 30 min with 3% Nonidet P40 in PBS before blocking step (24).

Indirect Immunofluorescence

Cryostat sections of rat liver, kidney, and stomach were used as substrate (BioSystem, Barcelona, Spain). Briefly, rabbit anti-LMN antibody (1/50), sera (1/40), purified IgG from SLE or parasitized patient sera (40

TABLE 1
Subclasses Distribution of IgG Anti-Laminin-Positive Sera

	SLE ($n = 10$)	Parasitized patients ($n = 17$)	Normal controls ($n = 2$) ^a	Normal controls ($n = 28$) ^b
IgG1	0.200 \pm 0.022 (0.304-0.098)*	0.283 \pm 0.040 (0.538-0.086)*	0.258 \pm 0.086 (0.344-0.171)**	0.016 \pm 0.002 (0.034-0)
IgG2	0.004 \pm 0.001 (0.013-0)	0.205 \pm 0.070 (0.896-0)***	0.021 \pm 0.020 (0.041-0)	0.031 \pm 0.005 (0.074-0)
IgG3	0.023 \pm 0.008 (0.08-0)	0.133 \pm 0.040 (0.438-0)***	0.010 \pm 0.010 (0.02-0)	0.041 \pm 0.004 (0.069-0)
IgG4	0.073 \pm 0.007 (0.108-0.043)	0.090 \pm 0.020 (0.318-0)	0.067 \pm 0.066 (0.133-0)	0.016 \pm 0.002 (0.047-0)

Note. Data indicate means \pm SEM.

^a Normal controls IgG anti-laminin positive.

^b Normal controls IgG anti-laminin negative.

* $P < 0.001$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs 28 normal controls.

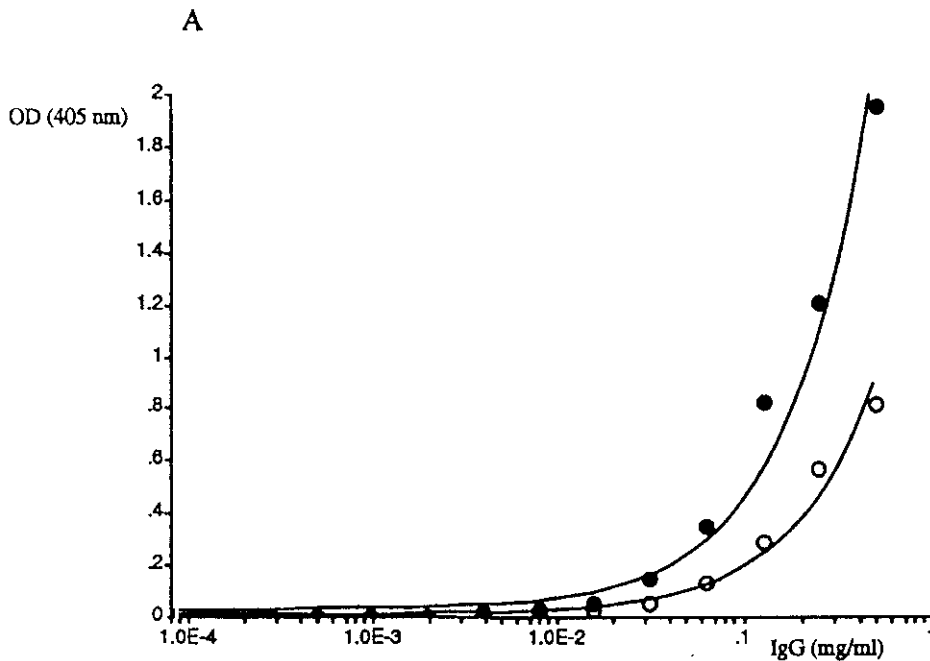


FIG 2. (A) Binding curves of the IgG fraction from pooled sera from SLE (open symbols) and parasitized patients (closed symbols). The two binding curves are similar ($\rho = 1, P < 0.001$). (B) Competition assay with LMN and fibronectin. Purified IgG fractions of pooled sera from SLE or parasitized patients adjusted to the same anti-LMN activity ($OD_{405 \text{ nm}}: 0.225$ and 0.1 mg/ml , respectively) were preincubated with variable concentrations of LMN (open symbols) or fibronectin (closed symbols). The mixture was reacted against LMN on ELISA as described under Material and Methods. The results are given as percentage of inhibition $((\text{noninhibited OD} - \text{inhibited OD})/\text{noninhibited OD}) \times 100$.

μg), purified IgG from a normal control anti-LMN-positive sera ($80 \mu\text{g}$), and purified IgG from pooled ELISA-negative sera ($80 \mu\text{g}$) were incubated for 30 min at room temperature with the sections. Bound antibodies were detected with either fluorescein-conjugated rabbit anti-human IgG (Dako, Glostrup, Denmark) or swine anti-rabbit immunoglobulins (Dako). After each incubation, the slides were washed three times for 5 min with PBS. After the final wash, slides were mounted with a solution of 70% glycerol in PBS and read in a Leitz Diaplan fluorescence microscope.

Cell Adhesion Inhibition Assay

U937 myelomonocytic cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and grown as described (25). Cells were preincubated for 20 min at 4°C with $50 \mu\text{g/ml}$ of human γ -globulin and for 30 min at 37°C with 50 ng/ml of phorbol myristate acetate (Sigma) before adhesion assay.

The adhesion assay was performed as previously described with some modifications (25, 26). Briefly, 96-well flat-bottomed plates were coated for 2 hr at 37°C with $50 \mu\text{l}$ of EHS LMN ($10 \mu\text{g/ml}$). Thereafter, the plate was washed and then saturated with PBS-1% BSA for 1 hr at 37°C . After washing, 100 or $50 \mu\text{l}$ of anti-LMN positive or negative sera, rabbit anti-LMN antibody or PBS-1% BSA were added and incubated overnight at 4°C . The plate was washed twice with

RPMI and 10^5 cells were added in serum-free medium and incubated for 30 min at 37°C . To quantify cell attachment the plate was washed twice with RPMI, and cells were fixed with a mixture of acetone:methanol 1:1 and dyed with violet crystal 0.5%. Then, absorbance at 540 nm was measured in an ELISA detector (Pasteur Laboratories, Paris, France). Basal adherence to BSA was subtracted from attachment values obtained, and the final results were expressed as percentage of inhibition: $(1 - (\text{attachment with sera or polyclonal anti-LMN antibody}/\text{attachment in anti-LMN-free wells})) \times 100$. The assays were performed in triplicate.

RESULTS

IgG anti-LMN Antibodies Response in SLE, Parasitized Patients, and Normal Control Sera

A total of 87 SLE, 30 normal controls, and 30 parasitized patient's samples of serum were analyzed by ELISA. In each assay, negative and known positive samples were assayed to serve as controls. The interassay coefficient of variation for a positive value was 16%. The mean of OD values were 0.263 ± 0.03 in SLE, 0.734 ± 0.07 in parasitized patients, and 0.120 ± 0.04 in normal control sera. This anti-LMN antibody response was elevated in SLE and parasitized patients vs normal control population ($P < 0.01$ and $P < 0.0001$ respectively).

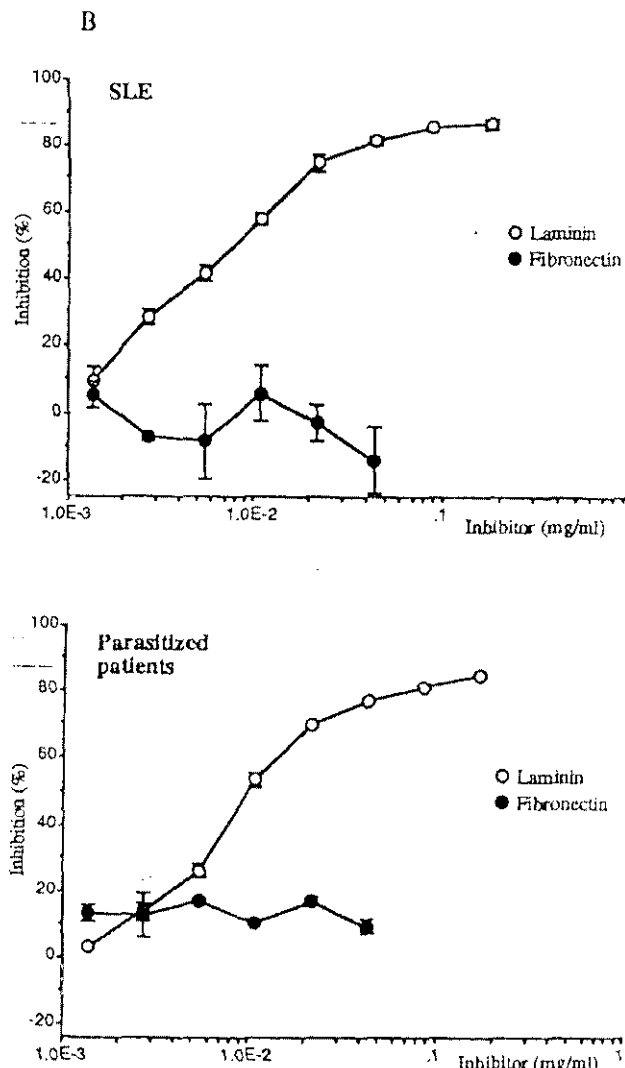


FIG. 2—Continued

Using two standard deviations above the mean of 30 normal controls as the cutoff for abnormal levels of IgG anti-LMN antibodies, 13.8% of SLE (12/87), 66.7% of parasitized patients (20/30), and two of the normal controls had these antibodies. In these assays, the cutoff was an optical density of 0.539. The titers of these antibodies were highest in patients with filariasis, whereas in SLE and the two normal control sera were similar (Fig. 1). The average IgG concentration in anti-LMN-positive sera was 2480 ± 898 mg/dl (parasitized patients), 1400 ± 401 mg/dl (SLE), and 948 ± 152 mg/dl (normal control ELISA positive sera). Thus, the IgG levels in SLE and normal control positive sera did not differ significantly ($P > 0.1$, ns).

IgG subclasses distribution of these antibodies showed that the response was mainly IgG1, although IgG2 and IgG3 were also elevated in parasitized patients (Table 1).

Analysis of the IgG Antibody Binding Capacity in SLE and Parasitized Patients

Chromatography on a protein G-sepharose was used to separate IgG in pooled sera from SLE or parasitized patients. Fractions were adjusted to the same protein concentration and serial dilutions were titrated by ELISA. As shown in Fig. 2A, the absorbance of the IgG fraction from parasitized patients was higher than that given by SLE patients. The two binding curves were similar ($\rho = 1$, $P < 0.001$), suggesting that the higher absorbance observed was due to a higher amount of IgG anti-LMN antibodies in parasitized patients but not to a different binding capacity or antibody affinity.

The ability of these antibodies to bind to LMN itself and fibronectin was then determined by competitive assays. For this assay, a mixture of purified IgG fractions adjusted to the same anti-LMN activity and competitor in varying concentration was preincubated overnight at 4°C and then added to LMN-coated wells. As illustrated in Fig. 2B, only LMN inhibited the binding of SLE and parasitized patients anti-LMN antibodies. The concentration of LMN required for 50% inhibition was 8 and 10 μ g/ml, respectively, supporting similar average antibody affinity in both groups of anti-LMN antibodies (27). This anti-LMN activity could not be inhibited with fibronectin (Fig. 2B).

By Western blot assay, the anti-LMN antibodies could be demonstrated in parasitized patients and ELISA-positive normal controls, but not in SLE sera (Fig. 3). In this experiment, some low-molecular-weight bands which did not correspond to LMN heavy

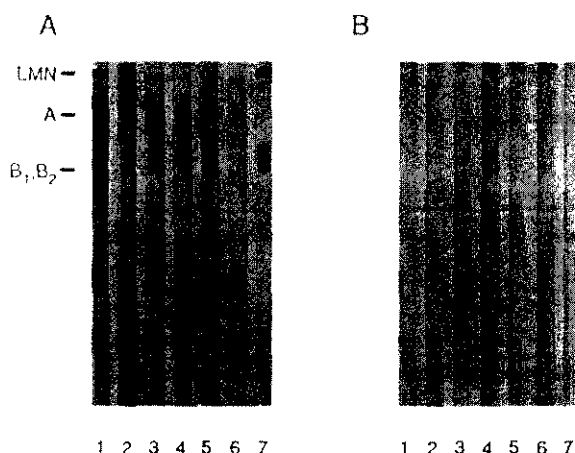


FIG. 3. Western blot with EHS LMN. Some sera recognize the typical bands produced by EHS LMN under denaturation and reduction conditions, including heavy A chain (400 kDa) and light B1 and B2 chains (230 and 220 kDa) (20). The high-molecular-weight band are probably nonreduced LMN detected as a consequence of the reduction treatment (5 min at 37°C). (A) Parasitized patients (lanes 1-5) and normal control ELISA positive sera (lanes 6 and 7). (B) Some SLE sera positive by ELISA did not recognize LMN heavy or light chains.

or light chain were detected, and it could be demonstrated by Coomassie blue staining of a SDS-polyacrylamide gel that they appeared after heating the LMN preparation (not shown).

Ability of Anti-LMN Antibodies to Bind to LMN under Different Conditions of Naturation

With the aim of analyzing if the differences observed by Western blot were due to a different ability of the antibodies to react with nated/denatured LMN, we evaluated the reactivity with LMN under varying conditions of naturation. The capacity of anti-LMN antibodies to bind to denatured LMN was first determined by competition assay. As shown in Fig. 4, the concentration of heat-treated LMN (100°C for 4 min) required for 50% of inhibition in the IgG fraction from parasit-

ized patients was similar to that obtained with native LMN (15 and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively). Although in SLE the two binding curves were similar ($\rho = 1$, $P < 0.05$), the concentration of heat-treated LMN required for 50% inhibition was four times smaller than native LMN (2 and 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively).

The reactivity with LMN under different conditions of naturation (native, heat-treated, and denatured with SDS/ β -mercaptoethanol or only with SDS) was then analyzed by a dot-blot assay. As shown in Fig. 5A, pooled sera from parasitized patients reacted with LMN under all conditions (panel A, note that the dots in lanes 3 and 5 are wider and it is probably due to the effect of SDS). In the opposite, pooled sera from SLE patients only reacted with native and heat-treated LMN (panel B, lanes 1 and 2). The anti-LMN antibodies detected by ELISA in the normal control sera reacted with native and weakly with denatured LMN (panel C, lanes 1 and 3). Pooled sera from anti-LMN-negative normal controls did not react with native or denatured LMN (panel D).

These differences of reactivity could also be demonstrated by Western blot with denatured or renatured LMN. As shown in Fig. 5B, pooled sera from parasitized patients reacted with both denatured and renatured LMN (panels A, B, and C, lane 2 in each panel), whereas pooled sera from SLE patients only reacted when LMN was renatured with either 3% NP-40 or Tris-20% glycerol (panels B and C, lane 3 in each panel). On the other hand, the anti-LMN antibodies detected in a normal control serum were only demonstrated when the renaturation was carried out with NP-40 (panel B, lane 4). In this experiment, LMN light chain was not detected by the sera and it could be related to the reducing treatment of LMN before it was applied on the SDS-polyacrylamide gel (5 min at 37°C).

Ability of Anti-LMN Antibodies to Inhibit the Binding of U937 Cells to LMN

Various types of cells have been shown to interact with LMN. The receptors for this glycoprotein are multiple and include at least six different integrins ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha 6\beta 4$) and a high-affinity 67-kDa receptor (7, 28, 29). With the aim of analyzing a possible physiologic implication, the ability of anti-LMN antibodies to inhibit the binding of U937 cells to LMN-coated surfaces was determined. These cells express $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6) integrin but not $\alpha 1\beta 1$ (VLA-1) or $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) by flow cytometry analysis (not shown). The binding was not inhibited by $\alpha 6$ mAb GoH3 as had been previously described (30), suggesting the presence of other LMN receptors implicated in this interaction (not shown).

As illustrated in Fig. 6A, some parasitized patient sera were able to inhibit the adhesion of U937 cells to

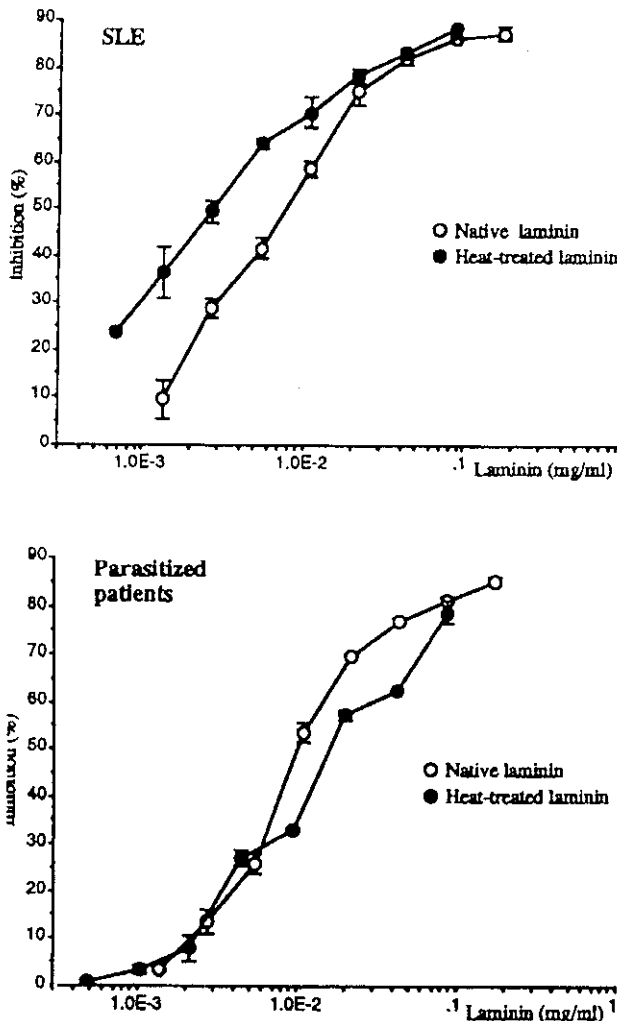


FIG. 4. Competition assay with native or heat-treated LMN (100°C for 4 min). Purified IgG fractions of pooled sera from SLE or parasitized patients adjusted to the same anti-LMN activity as in Fig. 2B were preincubated with variable concentrations of native (open symbols) or heat-treated LMN (closed symbols). The mixture was added to LMN-coated wells, and the results are given as percentage of inhibition.

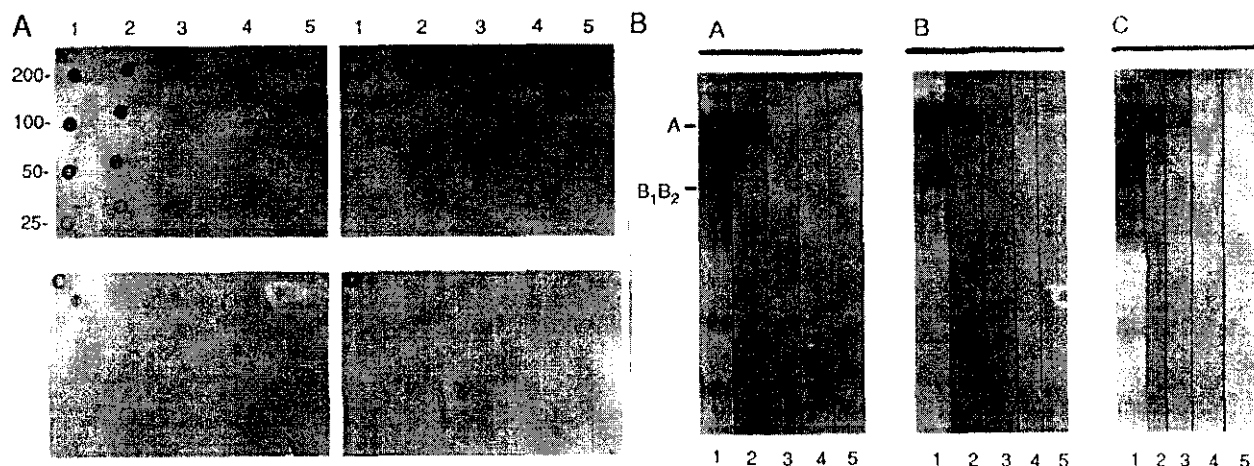


FIG. 5. Ability of anti-LMN antibodies to bind to native/denatured LMN. (A) Dot-blot assay with 200, 100, 50, and 25 μ g of LMN under varying conditions of denaturation: native (lane 1), heat-treated (100°C for 4 min, lane 2), denatured with 1%SDS/10% β -mercaptoethanol (lane 3), BSA (lane 4), and denatured with 1%SDS (lane 5). Panel A, pooled sera from parasitized patients; panel B, pooled sera from SLE patients; panel C, pooled normal control ELISA-positive sera; panel D, pooled ELISA-negative sera. (B) Western blot assay with denatured and renatured LMN. Panel A, denatured LMN; panel B, LMN renaturation with 3% NP-40; panel C, LMN renaturation with Tris-20% glycerol. Lane 1, polyclonal anti-LMN antibody; lane 2, pooled sera from parasitized patients; lane 3, pooled sera from SLE patients; lane 4, normal control ELISA-positive sera; lane 5, pooled ELISA-negative sera.

LMN. This inhibition was significantly associated with the presence of anti-LMN antibodies when the assay was carried out with 100 μ l of sera ($P < 0.0025$, Fig. 6B). There was no correlation between levels of IgG and percentage of inhibition ($r^2 = 0.02$).

Reactivity against Extracellular Components by Indirect Immunofluorescence

In order to analyze the reactivity against ECM components, all of the ELISA-positive sera as well as purified IgG fractions from individual sera were assayed on cryostat sections of rat liver, kidney, and stomach. Sera of parasitized patients showed similar reactivity against stomach smooth muscle compared to the polyclonal anti-LMN antibody (Fig. 7). This pattern was only demonstrated in sera with high titers by ELISA, and was also weakly detected with purified IgG from normal control serum positive by ELISA. In contrast, we could not identify the same pattern in SLE patients. Purified IgG from pooled anti-laminin-negative sera did not show this SCM pattern (Fig. 7).

DISCUSSION

In this work we have analyzed the presence of antibodies against the multidomain glycoprotein LMN in two groups of sera. One analysis included patients with SLE, an autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies directed toward a wide variety of autoantigens (18), and the other are patients suffering parasitic diseases (filariasis) where the possibility of cross-reactivity with nuclear and ECM autoantigens is supported by the presence of molecules

similar to self-components (19, 31, 32). The results showed that IgG anti-LMN antibodies were elevated in both SLE and parasitized patients ($P < 0.01$ and $P < 0.0001$, respectively). Using a two standard deviations above the mean of 30 normal controls as cutoff for abnormal levels of anti-LMN response, 13.8% of SLE, 66.7% of the parasitized patients, and two of the normal control sera had these antibodies.

The analysis of the binding capacity with purified IgG of pooled sera from SLE or parasitized patients showed a similar average antibody affinity ($P < 0.001$) with the same LMN concentration required for 50% inhibition (Fig. 2) and suggested that the anti-LMN antibodies detected in the two groups were similar. However, SLE sera did not recognize this antigen by Western blot, whereas parasitized patients recognized both LMN heavy and light chains (Fig. 3). We then analyzed the ability of these antibodies to bind to denatured forms of LMN. By a competitive assay, the concentration of heat-treated or native LMN required for 50% inhibition was similar in parasitized patients (15 and 10 μ g/ml, respectively, Fig. 4). However, in SLE heat-treated LMN appears to be a better inhibitor than native LMN and this result seems to be in disagreement with the lack of reactivity with denatured LMN by WB. We were unable to explain this discrepancy which probably is related to either the denaturation treatment of LMN (heat-treated or SDS/ β -mercaptoethanol), or the differences between a Western blot and a liquid-phase inhibition assay, but these results suggested different structural requirements for the recognition of LMN. This point was confirmed by dot-blot and Western blot assays. In dot-blot, the rec-

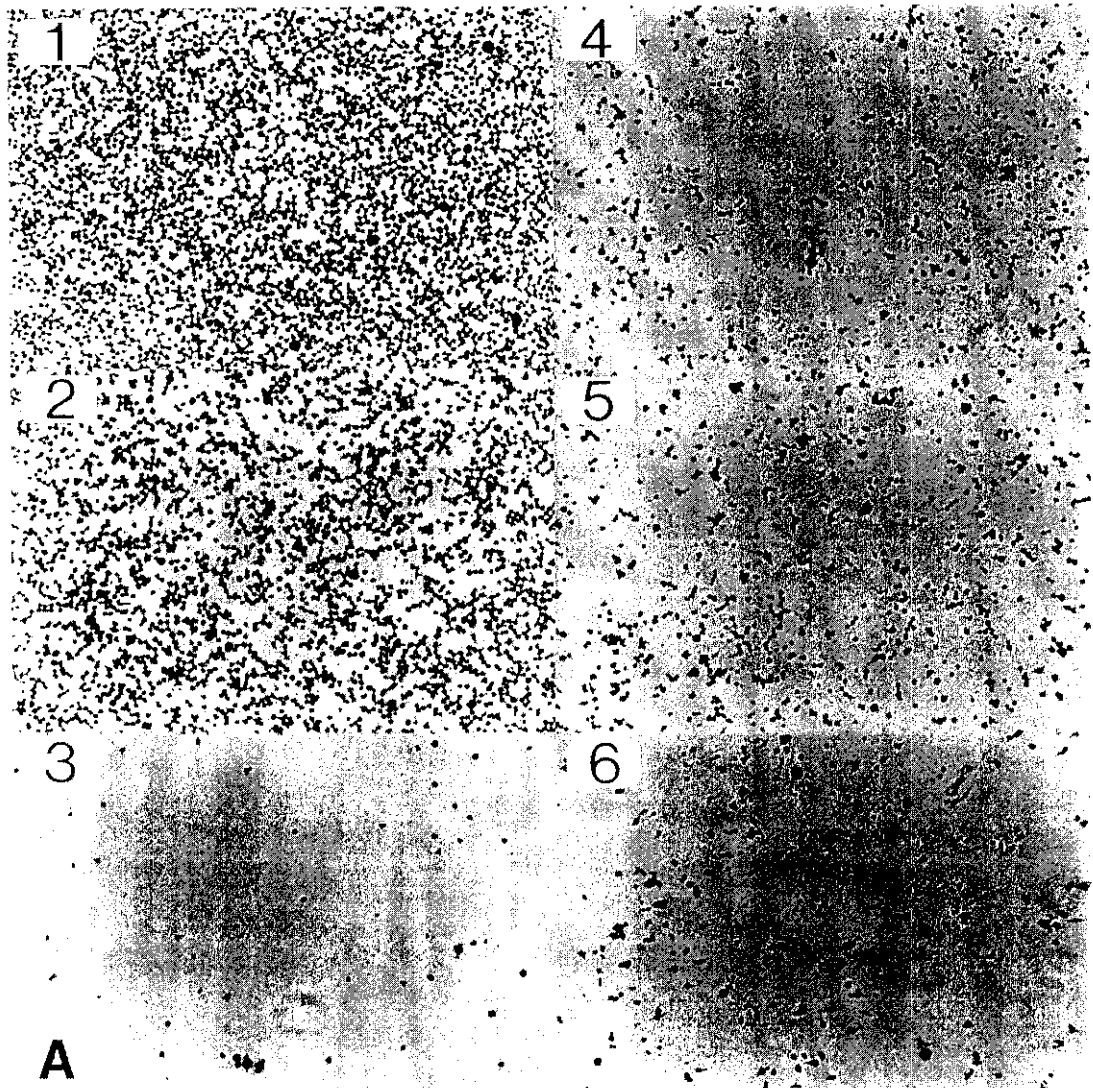


FIG. 6. Analysis of the ability of inhibition of the binding of U937 cells to LMN-coated surfaces. (A) 1, adhesion in absence of anti-LMN antibodies (PBS-PBSA); 2, adhesion with 100 μ l of a negative serum; 3, adhesion with a polyclonal anti-LMN antibody (1/100); 4, 5, and 6, some anti-LMN positive sera from parasitized patients (100 μ l). (B) Percentage of inhibition of U937 cell adhesion with a polyclonal anti-LMN antibody (1/100 and 1/20,000), 100 or 50 μ l of parasitized patient sera ($n = 12$), and 100 or 50 μ l of anti-LMN-negative sera ($n = 6$). * $P < 0.0025$ vs anti-LMN negative sera. Data indicate means \pm SEM.

ognition of LMN in SLE patients could be abolished with the treatment of LMN with SDS and β -mercaptoethanol but not after mild denaturation (Fig. 5A, panel B), whereas parasitized patients recognized LMN under all conditions (Fig. 5A, panel A). Moreover, pooled sera from parasitized patients recognized both denatured and renatured LMN by Western blot (Fig. 5B, lane 2 in each panel), whereas pooled sera from SLE patients only recognized LMN after renaturation with either 50 mM Tris-20% glycerol or 3% NP-40 (Fig. 5B, lane 3 in each panel).

We suggest that the recognition of this antigen in SLE patients depends of LMN conformation and it could be related to the lack of reactivity observed by

Western blot in this group of sera. This agrees with previous observations in which the binding of H241, a mAb anti-DNA antibody with anti-LMN activity derived from an MRL-*lpr/lpr* mice, could be abolished with the exposure of LMN to sodium dodecyl sulfate, whereas a polyclonal anti-LMN antibody also reacted with denatured LMN (20). In this way, the reactivity observed in parasitized patients was similar to those observed with a rabbit anti-EHS LMN by Western blot with denatured/renatured LMN (Fig. 5B, lanes 2 and 3 in each panel).

Other differences are related to the IgG subclasses distribution of this anti-LMN response. IgG1 was elevated in all groups whereas IgG2 and IgG3 were only

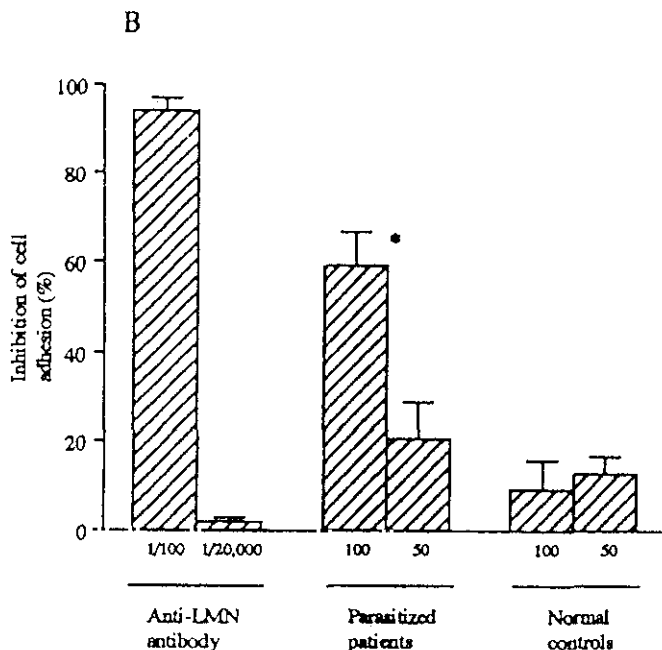


FIG. 6—Continued

elevated in parasitized patients (Table 1). The different isotype profile of autoantibodies directed toward the same autoantigen has been previously described in the response directed to ribosomal P proteins observed in patients with SLE and Chagas' disease (33). We also evaluated by sodium periodate oxidation if a possible IgG2-mediated antipolysaccharide response was responsible for the differences observed by Western blot (data not shown). The reactivity to periodate-treated LMN was not completely abolished suggesting that the anti-LMN activity detected in these sera was not only an antipolysaccharide response. Moreover, the anti-LMN activity could not be inhibited by fibronectin which is another highly glycosylated protein (Fig. 2B). Although we could not evaluate accurately the importance of the antipolysaccharide response due to the possible modification of amino acids on LMN (34), our results did not explain the differences observed by Western blot.

The analysis of the reactivity in the two normal control sera positive for anti-LMN antibodies showed that the reactivity was demonstrated only by ELISA and weakly by Western blot and dot-blot assays (Figs. 3 and 5). Although the average titers by ELISA were similar to those obtained with SLE sera (Fig. 1), they reacted with LMN by dot-blot and Western blot in a different manner. In Western blot assay with denatured LMN, the anti-LMN antibodies could be demonstrated in the two normal sera (Fig. 3). In Fig. 5B, one of these normal control sera did not recognize denatured LMN, and the lack of agreement with the results obtained in Fig. 3 could be related to the reducing

treatment (5 min at 37°C) before LMN was applied to the SDS-PAGE, which did not allow the detection of LMN light chains by the normal sera (Fig. 5B). This was supported by pooled parasitized patients sera which were also unable to detect LMN light chains, and they only reacted with LMN heavy chain (Fig. 5B). The differences of the anti-LMN antibodies detected in SLE and normal controls was demonstrated by the fact that the normal serum only recognized LMN with the renaturation treatment with 3% NP-40, whereas pooled SLE sera also reacted with LMN when the renaturation was carried out with 50 mM Tris-20% glycerol (Fig. 5B). In the dot-blot assay, the reactivity of pooled normal control sera was only demonstrated with native LMN and weakly with denatured LMN (Fig. 5A, panel C). Thus, the reactivity observed in these normal sera seems to be different than the anti-LMN antibodies detected in SLE and parasitized patients. Previous studies have demonstrated that normal subjects possess low titers of natural antibodies against the Gal α 1-3-Gal epitope presents in EHS LMN (15). Moreover, the presence of natural autoantibodies to purified EHS LMN in normal human sera has been described (35). These antibodies have been related to bacterial strains of the intestinal flora expressing these epitopes such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (36).

Indirect immunofluorescence assay with purified IgG from anti-LMN-positive parasitized patient sera revealed fluorescent staining surrounding stomach smooth muscle that resembled those obtained with a polyclonal anti-LMN antibody (Fig. 7). This pattern of anti-LMN antibodies was similar to those previously described (37) and was also detected in tubular basement membrane (not shown). However, we could not identify it in SLE patients, although some of these sera had the same titer by ELISA as those from parasitized patients which were positive by IIF. One possible explanation for this lack of reactivity is that the anti-LMN antibodies detected in SLE sera were cross-reacting with other autoantigens in the sections.

In chronic graft versus host disease, a model for the study of the autoimmune responses that characterize human SLE (38), the presence of IgG1 anti-LMN antibodies has been found to play a critical role in the renal immunopathology (39). It has been shown that anti-dsDNA autoantibodies, the major serological markers in SLE patients, are able to cross-react with ECM components (40). Moreover, some anti-DNA mAb can form glomerular immune deposits by binding to non-DNA antigenic structures that are present in extracellular locations within glomeruli (41). Sabbaga *et al.* have indicated that H241 mAb is able to cross-react with EHS LMN (20). Almost all the SLE anti-LMN-positive sera had anti-dsDNA autoantibodies by ELISA (not shown). However, whether the anti-LMN antibodies observed in human SLE cross-react with dsDNA and/

FIG. 7. Fluorescent staining on cryostat sections of rat stomach smooth muscle with a polyclonal anti-LMN antibody (A), or 40 μ g of purified IgG from parasitized patient (B), SLE (C), normal control serum positive by ELISA (D), or pooled ELISA-negative sera (E).

or are implicated in glomerular injury remains to be determined.

The presence of anti-DNA antibodies has also been described in the sera of patients with filariasis. Moreover, a strong correlation between the presence of chronic helminthic infection and the 16/6 idiotype, a public idiotype closely associated with the production of autoantibodies to DNA in SLE, has been demonstrated. However, in patients with filariasis the 16/6 idiotype occurs on non-DNA-binding antibodies (42).

Some works have suggested important functions for anti-LMN antibodies. Laminin or LMN fragments have been shown to be a chemotactic factor for mast cells, providing a mechanism by which these cells may be attracted to sites of tissue injury (43). Such activity

may be particularly relevant in the response of host tissues to inflammation accompanying parasitic infection, allergic reactions, or wound healing. Moreover, a polyclonal rabbit anti-LMN antibody was found to inhibit mast cell chemotaxis (43). On the other hand, previous studies have demonstrated that anti-LMN antibodies can modulate lymphocyte traffic (44). The demonstration that LMN is not confined exclusively to basement membranes but also is part of the stromal matrix supports the possibility that ECM components regulate lymphocyte traffic through the endothelium and within distinct lymphoid tissue microenvironments (44, 45).

With the aim of analyzing a possible physiologic implication of this anti-LMN activity, the ability of inhi-

27c

bition of the binding of U937 cells to LMN-coated surfaces was determined. As shown in Fig. 6, the presence of anti-LMN antibodies in the sera of parasitized patients correlates significantly with the ability of inhibition of U937 cell adhesion ($P < 0.0025$), and it could be related to a possible physiologic role of these antibodies. Thus, we speculate that the appearance of these antibodies could be a regulatory mechanism developed in a parasitized patient in order to avoid the host immune response. However, only with high volume of sera we were able to inhibit this cell adhesion and we cannot assess the functional importance *in vivo*. In this way, more studies with purified anti-LMN antibodies from sera as well as cell lines expressing a unique LMN receptor are necessary in order to evaluate more accurately these preliminary results. Unfortunately, we could not analyze it in SLE sera due to the high volume of sera required.

Whatever the significance of these antibodies, our results suggest that the recognition of LMN is quite different in SLE and filariasis. Thus, the differences of anti-LMN reactivity observed suggest that antibodies produced following deliberate immunization with autoantigens or similar molecules present in parasites are different from those spontaneously produced by individuals with autoimmune diseases such as SLE. In this regard, the existence of LMN-like molecules on the surfaces of parasites has been described (46), but whether filarial nematodes possess these molecules is unknown at present. These differences in the recognition of a single molecule could be related to a possibly pathogenic (SLE?) or protective role (parasitized patients?) of antibodies directed toward the same antigen in two different groups of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nieves Corrales, Dr. Miguel González, and María Jesús Ramos for technical support and critical reading, and Dr. Arnoud Sonnenberg from the Netherlands Cancer Institute for providing the rat monoclonal antibody GoH3 against the $\alpha 6$ integrin subunit.

REFERENCES

1. Beck, K., Hunter, I., and Engel, J., Structure and function of laminin: Anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* **4**, 148-160, 1990.
2. Timpl, R., Paulsson, M., Dziadek, M., and Fujiwara, S., Basement membranes. *Methods Enzymol.* **145**, 363-391, 1987.
3. Sasaki, M., Kleinman, H. K., Huber, H., Deutzmann, R., and Yamada, Y., Laminin, a multidomain protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 16536-16544, 1988.
4. Aumailley, M., Nurcombe, V., Edgar, D., Paulsson, M., and Timpl, R., The cellular interactions of laminin fragments. *J. Biol. Chem.* **262**, 11532-11538, 1987.
5. Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Martin, G., Kleinman, H. K., Robey, F. A., and Yamada, Y., Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis and receptor binding. *Cell* **48**, 989-996, 1987.
6. Kubota, S., Tashiro, K., and Yamada, Y., Signaling site of laminin with mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* **267**, 4285-4288, 1992.
7. Mecham, R. P., Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEB J.* **5**, 2538-2546, 1991.
8. Clément, B., Sequi-Real, B., Savagner, P., Kleinman, H. K., and Yamada, Y., Hepatocyte attachment to laminin is mediated through multiple receptors. *J. Cell Biol.* **110**, 185-192, 1990.
9. Languino, L. R., Gehlsen, K. R., Wayner, E., Carter, W. G., Engvall, E., and Ruoslahti, E., Endothelial cells use $\alpha 2 \beta 1$ as a laminin receptor. *J. Cell Biol.* **109**, 2455-2462, 1989.
10. Shimizu, Y., Van Severter, G. A., Horgan, K. J., and Shaw, S., Regulated expression and binding of three VLA ($\beta 1$) integrin receptors on T cells. *Nature* **345**, 250-253, 1990.
11. Ratkay, L. G., Tonzetich, J., and Waterfield, J. D., Antibodies to extracellular matrix proteins in the sera of MRL-*lpr* mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **59**, 236-245, 1991.
12. Gabrielli, A., Montroni, M., Rupoli, S., Caniglia, M. L., DeLustro, F., and Danieli, G., A retrospective study of antibodies against basement membrane antigens (type IV collagen and laminin) in patients with primary and secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum.* **31**, 1432-1436, 1988.
13. Huffstutter, J. E., DeLustro, F. A., and LeRoy, E. C., Cellular immunity to collagen and laminin in scleroderma. *Arthritis Rheum.* **28**, 775-780, 1985.
14. Moreland, L. W., Gay, R. E., and Gay, S., Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and SLE. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **60**, 412-418, 1991.
15. Towbin, H., Rosenfeld, G., Wieslander, J., Avila, J. L., Rojas, M., Szarfman, A., Esser, K., Nowack, H., and Timpl, R., Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American Cutaneous leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl ($\alpha 1-3$)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.* **166**, 149, 1987.
16. Gabrielli, P., Candela, M., Ricciatti, A. M., Caniglia, M. L., and Wieslander, J., Antibodies to mouse laminin in patients with systemic sclerosis (scleroderma) recognize galactosyl ($\alpha 1-3$)-galactose epitopes. *Clin. Exp. Immunol.* **86**, 367-373, 1991.
17. Avila, J. L., Rojas, M., and Towbin, H., Serological activity against galactosyl ($\alpha 1-3$)-galactose in sera from patients with several kinetoplastic infections. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 126, 1988.
18. Tan, E. M., Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44**, 93-141, 1989.
19. Damian, R. T., Molecular mimicry: Parasite evasion and host defense. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **145**, 101-111, 1989.
20. Sabbaga, J., Peres Line, S. R., Potocnjak, P., and Madaio, M. P., A murine nephritogenic monoclonal anti-DNA autoantibody binds directly to mouse laminin, the major non-collagenous protein component of the glomerular basement membrane. *Eur. J. Immunol.* **19**, 137-143, 1989.
21. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680, 1970.
22. Towbin, J., Staehelin, T., and Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354, 1979.
23. Van Dam, A. P., Van den Brink, H. G., and Smeenk, J. T., Technical problems concerning the use of immunoblots for the detection of antinuclear antibodies. *J. Immunol. Methods* **129**, 63-70, 1990.
24. Petit, C., Sauron, M. E., Gilbert, M., and Thèze, J., Use of immunoblotting to detect idiotypic determinants on monoclonal antibodies. *Methods Enzymol.* **178**, 144-149, 1989.
25. Arroyo, A. G., Sanchez-Mateos, P., Campanero, M. R., Martin-Padura, I., Dejana, E., and Sanchez-Madrid, F., Regulation of the VLA integrin ligand interaction through the $\beta 1$ subunit. *J. Cell Biol.* **117**, 659-670, 1992.
26. Dejana, E., Colella, S., Languino, L. R., Balconi, G., Corbascio, G. C., and Marchisio, P. C., Fibrinogen induces adhesion,

- spreading and microfilament organization of human endothelial cells *in vitro*. *J. Cell Biol.* **104**, 1403–1411, 1987.
27. Devey, M. E., Bleasdale, K., Lee, S., and Rath, S., Determination of the functional affinity of IgG1 and IgG4 antibodies to tetanus toxoid by isotype-specific solid-phase assays. *J. Immunol. Methods* **106**, 119–125, 1988.
 28. Huard, T. K., Malinoff, H. F., and Wicha, M. S., Macrophages express a plasma membrane receptor for basement membrane laminin. *Am. J. Pathol.* **123**, 365–370, 1986.
 29. Yannariello-Brown, J., Wewer, U., Liotta, L., and Madri, J. A., Distribution of a 69-kD laminin-binding protein in aortic and microvascular endothelial cells: Modulation during cell attachment, spreading, and migration. *J. Cell Biol.* **106**, 1773–1786, 1988.
 30. Kovach, N. L., Carlos, T. M., Yee, E., and Harlan, J. M., A monoclonal antibody to $\beta 1$ integrin (CD29) stimulates VLA-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *J. Cell Biol.* **116**, 499–509, 1992.
 31. Lux, F. A., McCauliffe, D. P., Buttner, D. W., Lucius, R., Capra, J. D., Sontheimer, R. D., and Lieu, T., Serological cross-reactivity between a human Ro/SS-A autoantigen (calreticulin) and the λ RAL-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J. Clin. Invest.* **89**, 1945–1951, 1992.
 32. Selkirk, M. E., Nielsen, L., Kelly, C., Partono, F., Sayers, G., and Maizels, R. M., Identification, synthesis and immunogenicity of cuticular collagens from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**, 229–246, 1989.
 33. Levin, M. J., Molecular mimicry and Chagas' heart disease: High anti-R-13 autoantibody levels are markers of severe Chagas heart complaint. *Res. Immunol.* **142**, 157–159, 1991.
 34. Feizi, T., and Childs, R. A., Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem. J.* **245**, 1–11, 1987.
 35. Berneman, A., Guilbert, B., and Eschrich, S., Avrameas S., IgG auto- and polyreactivities of normal human sera. *Mol. Immunol.* **30**, 1499–1510, 1993.
 36. Galili, U., Rachmilewitz, E., Peleg, A., and Flechner, I., A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J. Exp. Med.* **160**, 1519, 1984.
 37. Abrahamson, D. R., Irwin, M. H., St. John P. L., Perry, E. W., Accavitti, M. A., Heck, L. W., and Couchman, J. R., Selective immunoreactivities of kidney basement membranes to monoclonal antibodies against laminin: Localization of the end of the long arm and the short arms to discrete microdomains. *J. Cell Biol.* **109**, 3477–3491, 1989.
 38. Gelpi, C., Rodriguez-Sánchez, J. L., Martínez, M. A., Craft, J., and Hardin, J. A., Murine graft versus host disease: A model for study of mechanism that generate autoantibodies to ribonucleoproteins. *J. Immunol.* **140**, 4160, 1988.
 39. Florquin, S., Abramowicz, D., Heer, E., Bruijn, J. A., Doutrélepont, J. M., Goldman, M., and Hoedemaeker, P., Renal immunopathology in murine host-versus-graft disease. *Kidney Int.* **40**, 852, 1991.
 40. Faaber, P., Capel, P. J. A., Rijke, G. P. M., Vierwinden, G., Van de Putte, L. B. A., and Koene, A. P., Cross-reactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans. *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 502–508, 1984.
 41. Madaio, M. P., Carlson, J., Cataldo, J., Ucci, A., Migliorini, P., Pankewycz, O., Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form immune deposits. *J. Immunol.* **138**, 2883–2889, 1987.
 42. Thomas, M. A. B., Frampton, G., Isenberg, D. A., Shoenfeld, Y., Akinsola, A., Ramzy, M., Lilleywhite, J., and Williams, D. G., A common anti-DNA antibody idiotype and anti-phospholipid antibodies in sera from patients with schistosomiasis and filariasis with and without nephritis. *J. Autoimmun.* **2**, 803–811, 1989.
 43. Thompson, J. L., Burbelo, P. D., Yamada, Y., Kleinman, H. K., and Metcalfe, D. D., Mast cells chemotaxis to laminin with enhancement after IgE-mediated activation. *J. Immunol.* **143**, 4188–4192, 1989.
 44. Weglinsky-Kupiec, J. W., and De Sousa, M., Lymphocyte traffic is modified *in vivo* by anti-laminin antibody. *Immunology* **72**, 312–313, 1991.
 45. De Sousa, M., Tilney, N. L., and Kupiec-Weglinsky, J. W., Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. *Immunol. Today* **12**, 262–266, 1991.
 46. Bretana, A., Avila, J. H., Arias-Flores, M., Contreras, M., and Tapia, F. J., *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp: Immunocytochemical localisation of a laminin-like protein in the plasma membrane. *Exp. Parasitol.* **61**, 168–175, 1986.

Received July 25, 1994; accepted with revision February 17, 1995