



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MEDICINA

DETERMINACION DE LOS FACTORES
REUMATOIDES IgM, IgG e IgA MEDIANTE ELISA
EN LA ARTRITIS REUMATOIDE:
IMPLICACIONES CLINICAS Y ESTUDIO
PROSPECTIVO.

AUTOR: Antonio Naranjo Hernández

DIRECTOR: Miguel Ángel Muniain Ezcurra

25 de Noviembre de 1988

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

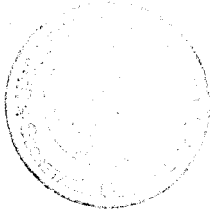
T. D.
N/25

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al tomo 160 número 4 del libro
correspondiente de.

Sevilla, 18 de octubre de 1984

El Jefe del Negociado de Teses,

Alma de Affitte



DETERMINACION DE LOS FACTORES REUMATOIDES Ig M, Ig G
E Ig A MEDIANTE ELISA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE :
IMPLICACIONES CLINICAS Y ESTUDIO PROSPECTIVO.

D. MIGUEL ANGEL MUNIAIN EZCURRA, PROFESOR TITULAR
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA,

CERTIFICA

Que D. Antonio Naranjo Hernández ha realizado
la TESIS DOCTORAL sobre "Determinación de los
Factores Reumatoides Ig M, Ig G e Ig A mediante
ELISA en la Artritis Reumatoide: implicaciones
clínicas y estudio prospectivo" bajo mi dirección
y la codirección del Dr. Navarro Sarabia, consi-
derándola apta para su lectura.

Sevilla, a de Octubre de 1988



El Director
Dr. Muniain Ezcurra



El Codirector
Dr. Navarro Sarabia

SR. PRESIDENTE DE LA COMISION DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD
DE SEVILLA.



AGRADECIMIENTOS:

Mi más sincero agradecimiento a cuantos han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral. Al Profesor Muniain Ezcurra y al Dr. Navarro Sarabia, por la ayuda inestimable. Y a José Miguel y a Mercedes, por la paciencia y cariño que han tenido conmigo.

INDICE	Pag.
INTRODUCCION	1
Historia de los Factores Reumatoides .	2
Técnicas para su determinación15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
MATERIAL Y METODOS	30
RESULTADOS	35
DISCUSION	56
CONCLUSIONES	69
RESUMEN	71
BIBLIOGRAFIA	74

I N T R O D U C C I O N

La Artritis Reumatoide (A R) es una enfermedad inflamatoria crónica, de distribución mundial, que afecta primariamente a las articulaciones y puede acompañarse de manifestaciones extraarticulares.

La etiología de la A R es desconocida, aunque los estudios realizados indican que existe un trastorno inmunológico en la iniciación y perpetuación de los eventos característicos de la misma. Tanto la respuesta humoral como la mediada por células parecen participar en la inmunopatogénesis⁽¹⁾.

Los criterios utilizados para el diagnóstico fueron revisados por la American Rheumatism Association (ARA) (2) y están basados en la probabilidad de que ocurran ciertas manifestaciones clínicas, analíticas y radiológicas.

Aunque en la A R pueden aparecer diferentes tipos de autoanticuerpos, los anticuerpos (Ac) anti-inmunoglobulinas, denominados **factores reumatoides** (F R) son los más característicos de la enfermedad. Se han descrito F R entre las cinco principales clases de inmunoglobulinas (Ig), aunque las pruebas habituales de aglutinación sólo determinan el F R Ig M. Estos Ac pueden reaccionar contra las moléculas completas de Ig M, Ig A, Ig G, Ig E y contra cadenas ligeras pero, en sentido estricto, sólo los Ac que reaccionan contra la Ig G (independientemente de la clase a la que pertenezcan) son considerados F R.

HISTORIA

DESCUBRIMIENTO DE LOS F R : Los F R fueron caracterizados por primera vez por el patólogo noruego Erik Waaler ⁽³⁾. En 1937 trabajaba con un test de consumo de complemento en el diagnóstico de la sífilis. Usando hematíes de carnero sensibilizados con Ig G de conejo, al añadir el suero de un paciente con sospecha de lúes, pero que realmente padecía A R , observó una peculiar aglutinación de los hematíes en lugar de la hemólisis esperada.

Posteriormente demostró un factor en el suero de algunos individuos con A R , excluyendo la posibilidad de que se tratara de hemaglutininas o heteroaglutininas, y comprobó que el complemento no era necesario para obtener aglutinación. Llegó a la conclusión de que el "amboceptor" (hematíes de carnero recubiertos con Ig G de conejo) era absolutamente necesario para la reacción.

Previamente, Meyer, en 1922 ⁽⁴⁾ había observado en un trabajo de rutina de fijación de complemento que el suero de ocho pacientes con cirrosis hepática o bronquitis crónica podía aglutinar hematíes sensibilizados con Ac.

Waalder continuó sus estudios ⁽⁵⁾, determinando que el llamado "factor activador de la aglutinación" era termoestable y pertenecía a la fracción de globulinas del suero, encontrándose generalmente en pacientes con A R activa.

En 1948, Rose et al ⁽⁶⁾ complementaron los descubrimientos previos con un estudio de 51 pacientes con A R, concluyendo que el F R podía ser importante para cuantificar la actividad de la enfermedad y en el diagnóstico diferencial entre A R y otras artropatías inflamatorias.

En 1936, Cecil ⁽⁷⁾ introdujo la hipótesis de que los estreptococos eran patogenéticos en la A R, tras observar

que el suero de los pacientes causaba una intensa aglutinación de algunos estreptococos. También observó que el estreptococo A era aglutinado a títulos más altos ⁽⁸⁾ que otros grupos de estreptococos, estafilococos y neumococos no encapsulados. Posteriormente se propuso ⁽⁹⁾ que esta propiedad del "factor activador de la aglutinación" era inespecífica.

Otros estudios ⁽¹⁰⁾ demostraron que la inmunización con peptidoglicanos altamente purificados de paredes bacterianas de estreptococo podían inducir Ac con actividad F R.

En la búsqueda de tests alternativos al descrito por Waaler, en 1946 Wallis ⁽⁹⁾ demostró que el suero de pacientes con A R era capaz de aglutinar partículas inactivas (coloide, partículas de látex ⁽¹¹⁾, poliestireno y bentonita) que habían adsorbido gammaglobulina en su superficie. Desde entonces ha sido utilizado ampliamente el test de "látex" ⁽¹²⁻¹⁴⁾ como prueba complementaria en el diagnóstico de la A R.

Las primeras sospechas de que podían existir otro tipo de factores en el suero de los pacientes con A R surgieron en 1957, cuando Franflin ⁽¹⁵⁾ caracterizó unos complejos solubles en pacientes con A R, a los que denominó "complejos intermedios", los cuales tenían peculiares características de sedimentación ^(16,17). Estos complejos estaban formados por F R Ig G. Similares complejos fueron descritos en el líquido sinovial de pacientes con A R ^(18,19). En los años siguientes se describieron F R entre las principales clases de Ig ⁽²⁰⁾.

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las moléculas de proteína que se combinan específicamente con los Ag se denominan Ac; en conjunto, las proteínas con actividad Ac reciben el nombre de Ig. Todas las moléculas de Ig poseen una estructura común, que consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos grandes y dos pequeñas, dispuestas como muestra la figura 1. La cadena polipeptídica grande se denomina pesada, y la pequeña, ligera.

Las Ig humanas están clasificadas en cinco clases en virtud de la estructura primaria de sus respectivas cadenas pesadas: Ig G, Ig A, Ig M, Ig D e Ig E. Existen dos tipos de cadenas ligeras: kappa y lambda. En el suero humano, aproximadamente el 65% de las moléculas de Ig G tienen dos cadenas pesadas gamma y dos cadenas ligeras kappa, mientras que el 35% tiene dos cadenas pesadas gamma y dos cadenas ligeras lambda. La misma distribución se aplica para las moléculas de Ig M e Ig A circulantes.

La Ig G se puede escindir mediante tratamiento enzimático con papaína en dos fragmentos: Fab (que se une al Ag) y Fc (fragmento cristalizante). Las moléculas de Ig G son bifuncionales, pues la capacidad de una molécula de Ac de combinarse con un solo determinante Ag reside en la región Fab de la molécula, mientras que ciertas propiedades biológicas que determinan la ulterior disposición del Ag residen en la porción Fc. Cuando se pone en contacto con pepsina, ésta rompe la molécula en una posición distal a la que tiene lugar con la papaína; los dos fragmentos de unión con el Ag permanecen unidos, denominándose $F(ab')_2$.

Las moléculas de Ig G tienen un peso molecular de 150.000 daltons y un coeficiente de sedimentación de 7S. Se han identificado cuatro subclases de Ig G según las diferencias Ag y estructurales de las cadenas pesadas, siendo las más abundantes en el suero humano la Ig G₁ y la Ig G₂.

La Ig M tiene un peso molecular de aproximadamente 900.000 daltons. Cada molécula consta de cinco subunidades idénticas de unos 180.000 d., compuestas de dos cadenas ligeras kappa o lambda y dos cadenas pesadas mu. Además, la molécula de Ig M contiene una cadena adicional: la cadena J o de unión (figura 2). Basándose en la presencia de diez unidades Fab, cabría esperar que las moléculas de Ac Ig M tuvieran una valencia de diez de fijación al Ag. Si bien este valor se halla experimentalmente en algunas moléculas de Ig M, se encontró una valencia cinco en otros casos. Esta disparidad en la valencia todavía no tiene explicación.

La Ig A monomérica tiene un peso molecular de 150.000 d. Cada molécula consta de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas alfa. Los polímeros (que están compuestos por dos o tres monómeros de Ig A) pueden encontrarse en el suero normal y constituyen una pequeña fracción de la Ig A sérica. Se han identificado dos subclases de Ig A, según las diferencias en la estructura de la cadena pesada: Ig A₁ e Ig A₂.

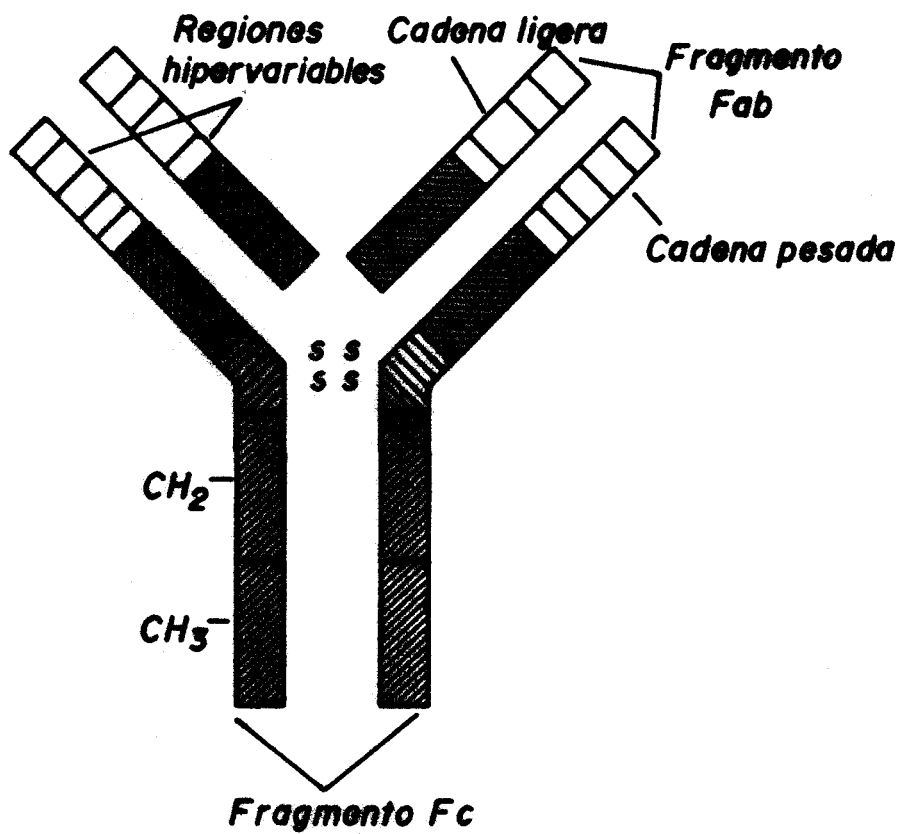
El tipo de Ig de las secreciones externas se caracteriza por un predominio de la Ig A secretoria, compuesta por dímeros de Ig A. Estos dímeros están formados por dos monómeros de Ig A, dos proteínas no Ig, la cadena J y el componente secretorio.

La Ig E consta de dos cadenas pesadas epsilon y dos cadenas ligeras kappa o lambda. Está presente en el suero humano normal en una concentración muy baja.

La Ig D humana normal es difícil de investigar debido a su baja concentración y a la tendencia a agregarse y fragmentarse durante el aislamiento. Consta de dos cadenas pesadas delta y dos cadenas ligeras.

Fig 1- Representación esquemática de una molécula de Ig G humana, compuesta por dos cadenas pesadas gamma y dos cadenas ligeras kappa ó lambda.

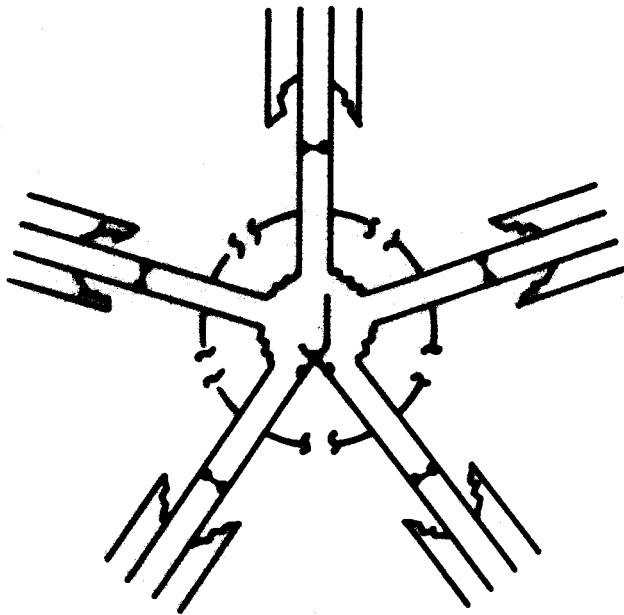
Fig. 1



Representación esquemática de una molécula de IgG humana

Fig 2- Representación esquemática de una molécula de Ig M, con cinco subunidades idénticas y la cadena J o de unión.

Fig. 2



Representación esquemática de una molécula de IgM.

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS DE LOS F R

Los F R existen entre las cinco principales clases de Ig, aunque se ha prestado mayor atención a los F R Ig M e Ig G. El significado patológico de los F R Ig A, Ig E e Ig D no es bien conocido.

El F R Ig M ha sido el mas frecuentemente investigado, por su capacidad de aglutinar hematíes o partículas recubiertas con Ig G, y son los únicos Ac detectados por el test de Waaler-Rose.

F R Ig M; La estructura básica de una molécula de F R Ig M no se diferencia de otros Ac pentaméricos, aunque han sido descritos F R monoméricos circulantes (21-23) en pacientes con títulos elevados de F R (24) y vasculitis reumatoide (25).

La valencia del F R Ig M no es diez, como se esperaría, sino cinco; este hecho parece debido a un obstáculo en la unión antígeno Ag-Ac, o a la reacción con los dos determinantes Ag disponibles sobre la misma molécula de Ig G.

La afinidad intrínseca del F R Ig M "in vitro" para el Ag es baja (10, 26, 27), al igual que el F R Ig G. Por otro lado, la alta afinidad por el Ag "in vivo" conduce a la formación de complejos (27, 28).

El F R Ig M fija el complemento por la vía clásica (29-31) tras su unión a Ig G. Esta fijación se intensifica cuando los F R Ig M se unen a complejos solubles que contienen Ig G.

A pesar de su baja afinidad por el Ag, los F R pueden inducir la formación de complejos estables con Ig G bajo condiciones adecuadas. El F R Ig M polivalente origina estos complejos cuando la Ig G está agregada. Aunque la unión de cada molécula de Ig M anti (Ig G - Ig G) es de baja energía para conseguir un complejo de vida larga, la

suma de múltiples interacciones producen una estructura estable.

F R Ig G; El F R Ig G está presente como Ac monomérico con un coeficiente de sedimentación en ultracentrifugación analítica de 10-18 S. La molécula es divalente, tanto como Ac como Ag, cuando se une a sí mismo, quedando entonces un segundo fragmento Fab libre, lo cual tiene importantes implicaciones patogénicas. Estas características la diferencian de la Ig G nativa no-F R, que sólo puede ser ligada como Ag a una molécula de F R Ig G (32).

Comparada con la distribución de cadenas ligeras en la Ig G humana normal, existe un incremento relativo de cadenas ligeras kappa para el F R Ig G en el suero de pacientes con A R (17). De igual modo ocurre con el F R Ig M (33).

Así como para el F R Ig M, la afinidad intrínseca del F R Ig G es de diez a cien veces mas baja que la afinidad de heteroanticuerpos comunes producidos tras inmunización exógena. A pesar de ello, se cree que existen algunos F R con alta afinidad que son "eliminados" del suero por el sistema reticuloendotelial y sólo se detectan "in vitro" (34).

Pope et al (35) comunicaron por vez primera en 1974 la existencia de autoasociación del F R Ig G; propusieron un modelo mediante el cual dos moléculas de F R Ig G formaban un dímero estable, con una constante de asociación de 10^{10} l/mol, mientras que para el F R Ig G con Ig G normal es de 10^5 l/mol. Dos lugares de combinación de Ac y dos determinantes Ag permanecen libres en cada dímero para permitir una ulterior agregación de dímeros, dependiente de concentración, formando tetrámeros, octámeros y agregados superiores.

En el suero este FR circula autoasociado, siendo disociable en condiciones ácidas. Sin embargo, complejos mucho mayores se encuentran en el líquido sinovial y extractos

tisulares ⁽³⁶⁾, así como en el interior de células plasmáticas antes de la liberación de los Ac.

La diferencia entre el suero y el líquido sinovial es debida a la relativa prevalencia del F R Ig G en relación con la Ig G no-F R en el líquido sinovial. De este modo, la autoasociación se ve favorecida en las articulaciones-afectadas, donde existe un exceso relativo de F R Ig G ⁽³⁷⁾.

La mayoría de los complejos intermedios previamente descritos en el suero de pacientes con A R están compuestos por dos moléculas de Ig G no-F R unidas a dímeros de FR Ig G. Se ha publicado ⁽³⁸⁾ una incidencia de estos complejos superior al 75% en pacientes con títulos elevados de F R Ig G mientras que son escasos en los pacientes seronegativos.

Se ha descrito, por otra parte, que los polímeros de F R Ig G activan el sistema del complemento ⁽¹⁸⁾.

En la tabla 1 se exponen las propiedades de los F R Ig M e Ig G ⁽³⁴⁾.

F R Ig A; Fue descrito inicialmente por Heimer en 1966 ⁽²⁰⁾. Se ha encontrado en las formas polimérica y monomérica, prevaleciendo la primera con las técnicas habituales ⁽³⁹⁻⁴¹⁾. Se descubrió asimismo que el F R Ig A tenía una valencia dos y una constante de asociación de 1.6×10^6 l/mol.

F R Ig E; Ha sido detectado en la mayoría de los pacientes con A R ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. Desde el punto de vista etiopatogénico se ha mencionado que los complejos que contienen F R Ig E pueden provocar liberación de histamina y otros mediadores de la inflamación, conduciendo a una intensa reacción inflamatoria y a crear condiciones favorables para la proliferación de fibroblastos en la articulación ⁽⁴²⁾.

* * *

ESPECIFICIDAD DEL F R

Al igual que otros Ac, los F R tienen especificidad a determinantes Ag definidos, algunos de los cuales están identificados en moléculas de Ig G humana y animal.

F R Ig M-

Está dirigido contra varios determinantes Ag en las regiones CH-2 y CH-3 de la porción Fc de la Ig G humana (27). Los Ac Ig M o Ig G dirigidos a la región Fab de la Ig G nativa intacta no son verdaderos F R. Estos determinantes incluyen (27,34):

- a- Ag compartidos por Ig humana y animal.
- b- Ag específicos sólo para Ig G humana.
- c- Ag encontrados en una o más subclases, pero no todas, de Ig G humana.
- d- Ag Gm genéticamente determinados sobre la porción Fc (aloantígeno); cada subclase de Ig G humana tiene su propia serie de Ag Gm.
- e- Ag expresados sobre complejos de Ig G, o bien digeridos por enzimas.
- f- Ag sobre Ig G monomérica autóloga.

La actividad del F R no es específica contra las Ig humanas; se ha descrito actividad cruzada hacia otros determinantes Ag, tales como elementos nucleares celulares (24,49,50) y peptidoglicanos de estreptococo (10).

Ningún determinante Ag particular, salvo el Ag Ga, es de importancia única en la A R (24,35); el Ag Ga es un determinante isotípico en la región CH-2, presente en todas las subclases de Ig G, excepto la Ig G₃ (46). Ello explica que los F R policlonales reaccionan pobremente con Ig G₃ humana (47).

En resumen, los F R Ig M reaccionan contra varios determinantes Ag diferentes en cada una de las subclases de

Ig G; un paciente dado puede tener varios F R orientados contra determinantes Ag diferentes.

La especificidad del F R tiende a ser más heterogénea en la A R que en otras enfermedades, con lo cual reacciona más fuertemente con Ig G animal (33,40). Ello explica el hecho de que el test de Waaler Rose sea más específico que el test de látex. Asimismo existen algunos F R que sólo reaccionan con Ig G de conejo.

En la tabla 2 se exponen los patrones de reactividad del F R Ig M.

El F R Ig M tiene gran avidéz por la Ig G agregada, lo cual es debido a la multivalencia de los complejos, más que a la aparición de "nuevos" determinantes Ag (34). Además, una orientación espacial homogénea de la porción Fc, producida por la agregación de Ig G, favorece la unión del F R (31).

F R Ig G

Son escasos los conocimientos sobre la especificidad exacta del F R Ig G, pero algunos determinantes Ag están localizados probablemente sobre la región CH-2 de Fc (36). El Ag Ga no se encuentra entre los determinantes Ag (32). Otros estudios (32) han probado que el grupo imidazol de histidina, en la región CH-2, está involucrado en la autoasociación del F R Ig G. Los lugares de unión a Ig G agregada, por otro lado, parecen ser los mismos que para la proteína A estreptocócica. No se han descubierto otros determinantes Ag para el F R Ig G (33), y probablemente los ya mencionados sean comunes al F R Ig M.

Los determinantes antigénicos para otros F R sobre el fragmento Fc de Ig G no son conocidos. Es probable que para el F R Ig A sea el antígeno Ga.

Tabla 2- Patrones de reactividad del F R Ig M

REACCION	Ig G NATIVA		Ig G humana Agregada
	Conejo	Humana	
PRECIPITACION	-	-	++
AGLUTINACION	+	+	++
INHIBICION DE LA FIJACION DEL COMPLEMENTO	-	-	++
INHIBICION AGLUTINACION	+	+ Ig G ₁₋₂	++
ACTIVIDAD CRUZADA CON Ig G DE CONEJO		+ Ig G _{1,2,4}	

F R MONOCLONAL

Los F R producidos en las gammapatías monoclonales tienen un corto espectro de especificidad, impidiendo la reacción con Ig G de individuos sanos o de otras especies; en ocasiones sólo reaccionan con Ig G heteróloga.

El análisis del F R monoclonal ha mostrado que éste tiene baja afinidad por la Ig G, y reconoce determinantes Ag en las regiones CH-2 y CH-3 de la Ig G₁, G₂ y G₄. La mayoría son portadores de cadenas ligeras de la familia VK III, particularmente del subgrupo VK IIIb (54,55).

Existe evidencia de que la mayoría de los pacientes con Síndrome de Sjogren primario, algunos con A R y unos pocos adultos sanos seropositivos, muestran una secuencia de aminoácidos que tienen reacción cruzada con este F R monoclonal.

Por último, en ciertas investigaciones se ha utilizado el F R monoclonal como instrumento para la detección de inmunocomplejos (18,56,57).

PRUEBAS PARA LA DETERMINACION DEL F R-

TEST DE AGLUTINACION; El fundamento del test de Waaler-Rose ha sido previamente descrito (utiliza hematíes cubiertos con Ig G de conejo). En el test de látex (utiliza Ig G humana) (14), el F R aglutina partículas inertes con Ig G unida a su superficie.

Los F R de pacientes sin A R reaccionan mejor con Ig G humana que con Ig G de conejo, por lo cual los test de látex y bentonita son más sensibles, pero menos específicos, que el Waaler-Rose (34,40). Este hecho ha motivado su utilización en revisiones amplias, siendo reexaminados por el test de Waaler-Rose las muestras positivas. Existen además algunos casos de látex negativo y Waaler-Rose positivo, indicando que el F R tiene especificidad sólo para la Ig G de conejo.

Otros test de aglutinación, como la prueba de la célula ovina sensibilizada y la aglutinación de la célula D humana (hematíes Rh positivo) han sido utilizados en ciertos laboratorios.

Los resultados de las pruebas de aglutinación se expresan como un título tras diluciones seriadas, obteniéndose títulos mayores con la prueba de látex que con la de Waaler-Rose.

Las técnicas de aglutinación detectan sólo el F R Ig M, el cual tiene una capacidad de aglutinación mil veces superior al F R Ig G. No son realmente cuantitativos, ya que la valoración final de la reacción es sólo aproximada, existiendo además dificultades para su standarización (58). Los resultados pueden variar de un laboratorio a otro, pudiendo asimismo alterar los resultados las variaciones del tamaño de las partículas inertes y el grado de agregación de la Ig G. A pesar de estos inconvenientes, el test de Waaler-Rose juega un papel central en el estudio de pacientes con artritis.

La Nefelometría Láser es otra modalidad de aglutinación, que utiliza partículas de poliestireno recubiertas con Ig G humana, y ofrece, según algunos autores (59-61) una mayor sensibilidad y reproductibilidad (62), siendo una de las pruebas más simples y rápidas para la determinación del F R Ig M. Por otro lado, es más objetiva al estar automatizada, mostrando una buena correlación con las técnicas de Waaler-Rose y látex, aunque con menor porcentaje de falsos positivos que este último (60,62).

El test de la Roseta Reumatoide (67) es similar a las técnicas de aglutinación descritas. Su empleo ha sido abandonado por ofrecer un elevado porcentaje de falsos positivos.

FACTOR REUMATOIDE" OCULTO"; En algunos pacientes con pruebas de aglutinación negativas para el F R, tras someter los sueros a filtración en gel en condiciones ligeramente ácidas (debilita la firme combinación de Ig G autóloga al F R Ig M) se encuentra actividad F R. A este factor se le denominó F R "oculto" (46,49,54).

TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA- En estas técnicas se utiliza el mismo substrato que en el test de Waaler-Rose, añadiendo finalmente Ig G de conejo anti-Ig humana conjugada con fluoresceína (55,56). Dependiendo de la Ig conjugada se pueden determinar los diferentes tipos de F R (F R Ig M, F R Ig A y F R Ig G) (43). Los tests de inmunofluorescencia, no obstante, se han abandonado en la práctica clínica por las dificultades de standarización y el tiempo empleado en los mismos.

Con la introducción de las **Técnicas de Inmunoabsorción** en 1967 (60) se produce un avance en la detección de los F R. Están basadas en el empleo de inmunoabsorbentes seguida de cuantificación por inmunodifusión radial simple, permitiendo la determinación de los F R Ig M e Ig G. La sensibilidad es superior al test de Waaler-Rose (60,67), aunque presenta con frecuencia falsos positivos para el F R Ig G (70). Se obtuvieron resultados más fiables cuando las anti-Ig anti-F R añadidas en el paso final eran los fragmentos F(ab')₂ para el F R Ig G. Asimismo, para evitar la interpretación de falsos positivos (unión de F R Ig M a Ig G), se procedió a un tratamiento previo del suero con pepsina ó agentes reductores y alquilantes.

Con esta técnica, pacientes controles y con osteoartritis tenían cantidades apreciables de F R Ig G.

El **RADIOINMUNOENSAYO (RIE)** conlleva una modificación de las técnicas de inmunoabsorción; la unión del F R a Ig G heteróloga adsorbida sobre superficies plásticas (71,73) o a un inmunoprecipitado heterólogo (74,75) es detectada por adición de anticuerpos radiomarcados anti-Ig humanas.

Al trabajar con altas diluciones, la IgG sérica y los inmunocomplejos rara vez comprometen la determinación precisa del F R Ig M. Un gran número de pacientes considerados seronegativos previamente, mostraron con esta técnica niveles elevados de F R Ig M (71), por su capacidad de detectar F R no aglutinantes. Otros autores modificaron esta técnica para la determinación del F R Ig A (39,75).

El RIE cuantifica de forma adecuada la concentración de F R, pudiendo reflejar la verdadera actividad F R. Como inconvenientes hay que destacar el manejo de radioactividad y su relativa carestía.

ENZIMA-INMUNO-ENSAYO (ELISA)

Es la técnica que utiliza un enzima conjugado al Ac, con su molécula substrato, siendo similar al RIE en su fundamento básico.

Originariamente, los tests inmunoenzimáticos fueron usados para detectar Ag en tejidos (76), adaptándose posteriormente para el manejo de fluidos vitales (77), y es lo que actualmente se conoce como ELISA.

Los postulados básicos de esta técnica son:

- 1- El Ag o Ac se une a una superficie sólida, manteniendo su reactividad.
- 2- Se añade el suero problema.
- 3- Posteriormente se añade la antiglobulina anti-F R ligada a un enzima.

4- Finalmente se pone en contacto con la molécula substrato del enzima acoplado a la Ig, provocando un cambio de color que se puede cuantificar mediante densidad óptica.

Dos sistemas enzima-substrato han sido los de mayor interés clínico:

- * Peroxidasa/ácido 5-aminosalicílico.
- * Fosfatasa alcalina/4-nitrofenilfosfato.

Diferentes autores han comprobado el valor de esta técnica en el estudio de los F R ⁽⁷⁰⁻⁸¹⁾, observando que tiene una mejor discriminación de los títulos cuando la Ig G está en forma compleja que cuando está presente en forma nativa.

Es conocido que la Ig G en fase sólida puede adsorber inespecíficamente F R Ig G, pudiendo dar falsos positivos para este F R ⁽⁴⁰⁾. Esta interacción, sumada a la que puede ejercer el F R Ig M, puede ser reducida por fragmentación con pepsina ^(70,82).

La técnica de ELISA permite la cuantificación de todas las Ig capaces de unirse a Ig G agregada. La mayoría de los F R reaccionan tanto con Ig G humana como con Ig G de conejo.

El ELISA no trabaja con radioactividad, es sensible ^(77,80,83), objetivo, rápido y barato. Por ello parece más prometedora que el RIE para la determinación de los F R.

Se ha observado una buena correlación con el test de Waaler-Rose ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾, y con el test de látex ^(84,85), con una tasa de discordancia entre los métodos inferior al 5 % ^(83,85), y una excelente reproductibilidad (variaciones inter e intra-ensayo inferiores al 10 %) ^(84,85).

Existen varias propuestas sobre el tipo de Ig G que debe adsorberse en los platos de microtítulo utilizados en la técnica ^(86,87), aunque se encuentra una mayor especificidad con Ig G humana o de conejo.

PRODUCCION CELULAR DEL F R

Se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia para detectar la presencia de F R en el citoplasma (88-90), y técnicas que demuestren la presencia de F R Ig M fijador del complemento (91) y de F R Ig G e Ig A (92). Con estas pruebas se han detectado F R de alta afinidad por la Ig G humana (88), que probablemente nunca alcanzan el suero, siendo precipitadas localmente.

LUGARES DE PRODUCCION DEL F R

Sólo una pequeña proporción del F R detectado en el suero es producido por los linfocitos circulantes. En los pacientes con A R, así como en sujetos sanos, existen no obstante unas pocas células que espontáneamente (93-95) (o tras estimulación con mitógenos) (96-98) segregan Ig ó F R.

Las células sinoviales de la articulación reumatoide producen Ig en cantidades y distribución similares a las producidas por nódulos linfoides y bazo, en contraste con la sinovial normal, que sólo produce cantidades insignificantes. Diferentes estudios han comunicado la presencia de F R Ig M (88) y F R Ig G (89, 90) en el citoplasma de células de tejido sinovial, tanto de pacientes seropositivos como seronegativos (99-102).

El F R del líquido sinovial es producido localmente por linfocitos de la membrana sinovial reumatoide (103-105), o bien en el mismo líquido sinovial, aunque ambas sólo representan una pequeña proporción de la cifra total de Ig producidas.

La médula ósea (93), nódulos linfoides, nódulos subcutáneos (88), bazo (90), pleura y pericardio (104, 107), músculo estriado y glándula salival (89, 108) son otros lugares importantes en la producción de F R en la A R. Este hecho indica que los F R son producidos en los lugares de inflamación o en los órganos inmunológicamente activos más que

por los linfocitos circulantes (102,105). Los lugares de producción en otras enfermedades crónicas que cursan con F R positivo no han sido investigados, pero probablemente acompañan a la producción general de Ig.

ETIMULACION DE LA PRODUCCION DE F R

El F R puede ser detectado en pacientes aparentemente sanos (27,34,109), sobre todo en los de mayor edad (40). Asimismo, es posible estimular los linfocitos de sangre periférica de controles sanos para producir F R "in vitro" (94,110,111). Por tanto, el Fel F R parece formar parte de las Ig ordinarias en personas adultas.

Debido a una alteración en el sistema regulador de los linfocitos B y T, o bien a la transformación de la Ig G normal en inmunogénica (27,34), el F R se encuentra en cantidades patológicas en múltiples enfermedades crónicas, incluyendo la A R. Otros mecanismos han sido también propuestos (34,45):

- * reactividad cruzada de la porción Fc de la Ig G y otros antígenos, particularmente nucleares.
- * sensibilización durante la gestación.

ENFERMEDADES QUE SE PUEDEN ASOCIAR CON EL F R Ig M-

El F R Ig M no es específico de la A R pues existen variadas patologías en las que puede estar presente en el suero, desde otras enfermedades reumáticas, pasando por las infecciones y las hiperglobulinemias, como se refleja en esta clasificación:

ENFERMEDADES DEL TEJIDO CONECTIVO- Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico, Esclerodermia, Enfermedad mixta del conectivo, Síndrome de Sjogren.

OTROS REUMATISMOS- Gota, Pseudogota.

ENFERMEDADES VIRALES AGUDAS- Mononucleosis Infecciosa, Hepatitis, Influenza, post-vacunación.

ENFERMEDADES PARASITARIAS- Tripanosomiasis, Kala-Azar, Paludismo, Bilharziasis, Esquistosomiasis, Filariasis.

ENFERMEDADES BACTERIANAS CRONICAS- Tuberculosis, Lepra, Brucelosis, Endocarditis bacteriana subaguda, Lúes, Salmone-llosis.

NEOPLASIAS- Se han descrito casos tras radioterapia o quimioterapia.

HIPERGLOBULINEMIAS- Púrpura hipergammaglobulinémica, Crioglobulinemias, Waldenström, hepatopatías crónicas, fibrosis pulmonar, Silicosis, Asbestosis y Sarcoidosis.

Muchas de estas situaciones están también asociadas con hipergammaglobulinemia, indicativa de activación policlonal de los linfocitos B.

La especificidad del F R para la A R se eleva con:

- * positividad en dos o más ocasiones consecutivas.
- * títulos altos.
- * reactividad tanto con Ig G humana como de conejo.
- * distribución entre las clases de F R Ig M, Ig G e Ig A.
- * títulos elevados el líquido sinovial.

Por tanto, no debería utilizarse una sola determinación como criterio diagnóstico de A R.

INFLUENCIAS GENETICAS SOBRE LA PRODUCCION DE F R

Los factores genéticos ejercen una modesta influencia sobre la capacidad de formar F R Ig M. Existe un incremento en la frecuencia de HLA DRw-4 en pacientes con A R seropositiva (60-90 %) en comparación con los seronegativos (10-25 %) e individuos sanos (112-114).

* * *

INFLUENCIAS MEDIOAMBIENTALES

En estudios de experimentación animal se indujo la producción de F R tras inmunización con Ig G agregada, Ag bacterianos y Ag proteínicos solubles ⁽¹¹⁵⁾. Esta producción fue generalmente policlonal, con F R a título bajo.

Los estudios referidos a la presencia de F R Ig M en controles sanos indican que existe una capacidad quiescente que puede ser activada por ciertos estímulos. El virus de Epstein-Barr es el único activador policlonal bien descrito de linfocitos B humanos inmaduros, los cuales tienen abundantes precursores de F R Ig M ⁽¹¹⁶⁾. Los pacientes con A R, por otro lado, tienen hasta cuatro veces más elevado el título de anticuerpos anti-virus de Epstein-Barr. Se desconoce el modo en que este hecho contribuye al proceso de la enfermedad.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL F R Ig M

Tradicionalmente los F R se han considerado como factores importantes en la patogénesis de la inflamación articular en la A R. Estas consideraciones están basadas en la producción de F R por la membrana sinovial reumatoide ^(100,116) y la formación de inmunocomplejos por estas Ig ^(18,21,26,50), con el potencial de activar la vía clásica del complemento ^(27,30). Estas observaciones condujeron a la predicción de que los individuos seropositivos experimentan una enfermedad más agresiva que los seronegativos.

Se han atribuido otras variadas funciones a la presencia de F R Ig M en el suero:

- * El F R libre es probablemente inocuo.
- * Puede reducir las manifestaciones de la enfermedad del suero ⁽¹¹⁷⁾.
- * Puede reducir la lisis celular mediada por el complemento ⁽¹¹⁸⁾ y la citotoxicidad mediada por células.

- * Agravamiento de la enfermedad producida por inmunocomplejos (120,121).
- * Activación de los polimorfonucleares (122,123).
- * Inhibición de la fagocitosis de bacterias recubiertas con Ig G.
- * Incremento de la unión de un Ac a su Ag (124).
- * Amplifica la actividad de fijación de complemento de otras moléculas de Ig G de baja afinidad (27,125).
- * Incremento del tamaño de inmunocomplejos, facilitando su atrapamiento por el sistema reticuloendotelial (126).
- * Protección renal en el Lupus Eritematoso sistémico (127).
- * Regulación de la respuesta de Ac Ig G por interacción con la Ig G de membrana de las células B (128,129).

EFFECTOS BIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS DE OTROS F R

La autoasociación del F R Ig G ejerce su actividad biológica fundamentalmente a través de la activación del complemento (10,130,131), sobre todo a nivel del líquido sinovial. Además, la autoasociación conduce a la liberación de prostaglandina E-2 y factor celular monoclonal desde las células sinoviales, y finalmente a la inflamación crónica (33).

El F R Ig A puede activar la vía alterna del complemento cuando se encuentra en la forma polimérica (101) y activar los polimorfonucleares (123).

SIGNIFICADO CLÍNICO DEL F R Ig M

La presencia de F R en el suero es un hallazgo común en la A R (60%-80% de los casos por las técnicas de aglutinación), cifrado hasta en un 90 % por RIE y ELISA (27,41,132), aunque en muchos otros procesos crónicos puede estar presente a título bajo. En individuos sanos, la presencia de títulos elevados aumenta la posibilidad de padecer A R, y en la Artritis crónica juvenil, el F R Ig M es característico del

grupo de comienzo poliarticular.

Determinado en líquido sinovial, el test para el F R es menos exacto que en el suero, y necesita tratamiento previo con hialuronidasa. A este nivel puede existir un bloqueo de la actividad F R por inmunocomplejos, ó digestión por enzimas proteolíticos.

Se ha detectado también en saliva, aunque a títulos más bajos que en el suero, en A R y Síndrome de Sjogren primario (37, 108).

Algunos autores han observado una correlación entre los niveles de F R Ig M por un lado y actividad de la enfermedad y nivel de inmunocomplejos circulantes por otro (44).

SIGNIFICADO CLINICO DEL F R Ig G

Se ha encontrado en el suero de pacientes con A R en un 55-100 % de los pacientes seropositivos, y en un 25-70 % de los seronegativos (88, 131, 133). Cuantitativamente es el más importante en la A R, siendo también sintetizado en pequeñas cantidades en sujetos sanos (10, 44, 69), Lupus Eritematoso, Endocarditis bacteriana subaguda (134) y otras enfermedades inflamatorias, probablemente como respuesta a la presencia de inmunocomplejos circulantes.

La A R, tanto seropositiva como seronegativa, se caracteriza por la presencia de un significativo incremento de la síntesis de F R Ig G (130). En el líquido sinovial se pueden encontrar niveles mayores que en el suero (37, 133).

Algunos estudios han observado una correlación entre los niveles elevados de F R Ig G y estadio funcional (139), y una mayor correspondencia con la presencia de vasculitis reumatoide (131, 135-137) que el F R Ig M. Estos datos, junto a la correlación con la actividad de la enfermedad (139-141) y con el nivel de inmunocomplejos circulantes, sugieren que el F R Ig G puede ser importante en la patogénesis de la A R.

No se han definido, no obstante, las indicaciones para su determinación de rutina en los laboratorios.

SIGNIFICADO CLINICO DE OTROS F R

El F R Ig A se encuentra frecuentemente elevado en pacientes con A R (cifras del 25-85 %) (61, 142, 143), siendo su significado diagnóstico y pronóstico poco conocidos. Algunos autores han correlacionado los niveles de este F R con los de F R Ig M (108, 144, 145). Su presencia también ha sido descrita en líquido sinovial (143), saliva (37, 108) y orina (146).

También se ha observado una correspondencia entre niveles de F R Ig A, actividad de la enfermedad (44, 142, 145) y con el nivel de inmunocomplejos circulantes (44).

En sujetos sanos (65, 66, 145), Síndrome de Sjogren primario (147), Artritis crónica juvenil, enfermedad de Berger (148) y otras patologías también se han encontrado niveles apreciables de F R Ig A.

El F R Ig E ha sido menos estudiado. Se han publicado incidencias de un 70 % en A R (42, 44), y correlacionado con la presencia de manifestaciones extraarticulares (42, 44, 49, 150),. Ha sido encontrado asimismo en pacientes con Asma bronquial (42, 44) y artritis crónica juvenil (43).

F R Y RESPUESTA A TRATAMIENTOS

El título de F R Ig M se ha utilizado para el seguimiento del tratamiento de pacientes con endocarditis bacteriana subaguda (151). En pacientes con A R se ha observado un descenso de los niveles con tratamiento "de fondo" (152-155), tanto del F R Ig M como de los F R Ig G e Ig A, pudiendo evolucionar en algunos pacientes a seronegatividad.

La D-penicilamina parece provocar un descenso menos marcado del F R Ig M que las sales de oro (153, 154); estos

hallazgos han conducido a la conclusión de que la D-penicilamina produce mejoría clínica de la A R por un mecanismo diferente a las sales de oro.

F R Y PRONOSTICO

La mayoría de los pacientes con A R tienen F R detectable en el suero en algún momento de la enfermedad, incrementándose la frecuencia con la duración de la misma. El F R Ig M está presente generalmente en los pacientes con nódulos y manifestaciones extraarticulares (137, 154), tendiendo a permanecer el título constante a lo largo de la evolución (157).

El F R Ig M se ha considerado un indicador pronóstico destacado en los pacientes con A R, respecto a la capacidad funcional y el desarrollo de erosiones (158, 160).

El F R Ig G a títulos elevados se ha correlacionado con deterioro de la capacidad funcional (137), y el F R Ig A con el desarrollo de erosiones (144, 145, 161) y manifestaciones extraarticulares (44).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Artritis Reumatoide (A R) es una enfermedad poliarticular con complicaciones sistémicas, caracterizada por la presencia en el suero de la mayoría de los pacientes de antiglobulinas denominadas Factores Reumatoides (F R).

Las primeras técnicas utilizadas para cuantificar el F R Ig M estaban basadas en la cualidad del suero de pacientes con A R de aglutinar hematíes o partículas cubiertas con Inmunoglobulina G (Ig G) y, por este medio, los pacientes se clasifican desde entonces en seropositivos y seronegativos.

Posteriormente se han introducido técnicas más sensibles como el Radio-inmuno-ensayo (RIE) y Enzima-inmuno-análisis (ELISA), que pueden cuantificar adecuadamente el F R Ig M y, además, determinar la presencia de otros F R.

La comprensión del papel de los F R en la A R implica la utilización de métodos sensibles y específicos. De capital importancia en el manejo clínico de la A R ha sido la búsqueda de parámetro no sujetos a las variaciones interobservador, objetivos, que puedan utilizarse como indicadores de las fluctuaciones en la actividad clínica en un paciente dado, y servir de valor pronóstico.

En los últimos años se han comunicado estudios sobre las distintas clases de F R que proporcionan información experimental sobre cuestiones como respuesta a tratamientos, predicción del desarrollo de erosiones articulares, y sobre la patogénesis de la vasculitis reumatoide.

Dado que existen datos heterogéneos acerca de la utilidad de las diferentes clases de F R en la valoración clínica y pronóstico de los pacientes con A R, nos propusimos, mediante la técnica de E L I S A, estudiar la prevalencia, implicaciones clínicas y valor pronóstico de los F R

Ig M, Ig G e Ig A en nuestro medio. De este modo, analizamos con detalle la relación entre F R y actividad de la enfermedad, hallazgos radiológicos, manifestaciones extraarticulares y análisis prospectivo a lo largo de un año. Asimismo, realizamos un estudio comparativo de los F R -E L I S A entre sí y con el test de Waaler-Rose.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES- En este estudio fueron incluidos 122 pacientes, 29 varones y 93 mujeres, con A R definida o clásica. Aunque los criterios de la ARA han sido modificados, hemos utilizado los originales)^(142, 143). La edad media fue de 54 años (rango 23-80); El tiempo de evolución de la enfermedad fue agrupado en cuatro categorías, como se refleja a continuación.

evolución	n	%
1-5 años.....	44	(36%)
6-10 años.....	40	(33%)
11-15 años.....	13	(11%)
>15 años.....	25	(20%)

Se utilizó el Índice de Lansbury ⁽¹⁴⁴⁾ modificado para cuantificar la actividad clínica de la artritis, basado en los siguientes parámetros:

- * rigidez matutina (en minutos).
- * astenia (hora de comienzo tras iniciar las tareas diarias).
- * número de articulaciones dolorosas.
- * número de articulaciones inflamadas.
- * velocidad de sedimentación globular a la primera hora.

Con los datos obtenidos, los pacientes fueron distribuidos en cuatro categorías de actividad de la A R:

actividad A R	n	%
1- ACTIVIDAD MINIMA O AUSENTE	21	17%
2- ACTIVIDAD DISCRETA	42	34%
3- ACTIVIDAD MODERADA	31	25%
4- ACTIVIDAD SEVERA	28	23%

La capacidad funcional (145) se evaluó en base a los siguientes grados:

- GRADO 1- el paciente puede desarrollar todas sus actividades.
- GRADO 2- capacidad adecuada; dolor o limitación en una o mas articulaciones.
- GRADO 3- actividad limitada al cuidado personal y escasas ocupaciones habituales.
- GRADO 4- grave limitación; incapaz de atender al cuidado personal; confinado a una silla de ruedas.

Con estos criterios, la muestra de pacientes con A R estudiada se dividió en cuatro grados: grado I- n=23, grado II n=62, grado III- n=31, grado IV- n=6.

El estadio radiológico fue evaluado a nivel de manos y pies por la escala de Steinbrocker (145), definida por:

- GRADO I- no hay cambios destructivos, puede existir osteopenia periarticular.
- GRADO II- osteoporosis periarticular con o sin destrucción de hueso subcondral; puede existir estrechamiento del espacio articular.
- GRADO III- evidencia de destrucción de hueso y cartilago y deformidad articular; no existe fibrosis o anquilosis ósea.
- GRADO IV- estadio III más anquilosis fibrosa ú ósea.

De este modo, los pacientes fueron clasificados en:

grado	nº	%
I-	14	(11%)
II-	45	(37%)
III-	33	(27%)
IV-	30	(24%)

Además de la analítica de rutina, a todos los pacientes se les realizaron las siguientes pruebas complementarias:

- * proteinograma.
- * anticuerpos antinucleares (ANA) (inmunofluorescencia).
- * Rosa de Bengala y test de Schirmer; se consideró positivo un flujo lacrimal inferior a 15 mm a los 5 minutos con la utilización de tiras de papel estándar.
- * radiografías de manos y pies comparadas, tórax, columna dorsal y Radiogrametría del 2º metacarpiano.

De los pacientes con A R , 46 de 109 (42%) presentaron ANA positivo, y 41 de 102 (40%) tuvieron un test de Schirmer inferior a 15 mm. Tres pacientes cumplían criterios de Síndrome de Sjogren. En ocho casos se detectó fibrosis pulmonar radiológica, y en cuatro pacientes se comprobó histológicamente la presencia de amiloidosis. En un 40% de la muestra se objetivaron nódulos reumatoides.

CONTROLES- 69 controles sanos fueron incluidos en el estudio, 20 varones y 49 mujeres, con una edad media de 49 años (rango 24-68).

SUEROS- A todos los individuos estudiados se les extrajo sangre para la realización del F R , en el momento de ser incluidos en el estudio y al año siguiente, cuando se realizó la segunda evaluación. Las muestras fueron almacenadas en alíquotas a -25 °C hasta ser analizadas.

* * *

MATERIAL-TAMPONES-

BUFFER FOSFATO (PBS): Cloruro sódico: 8 gr/litro
 Cloruro potásico: 0.2 gr/l
 Fosfato disódico: 1.5 gr/l
 Fosfato monopotásico: 0.2 gr/l
 Agua destilada c.s.p. 1 litro
 pH : 7.38

PBS-BS: Suero fetal de ternera diluido al 10 % en PBS.

BUFFER DIETANOLAMINA: Cloruro magnésico: 0.1 gr/l
 Azida: 0.2 gr/l
 Dietanolamina: 97 ml/l
 Agua destilada: c.s.p. 1 litro
 pH: 9.8

FACTOR REUMATOIDE

WAALER-ROSE.- Realizado con la técnica de Milgrom ⁽¹⁹⁶⁶⁾ (Cellognost-Behring), considerando positivo un título superior a 1/16. Dos muestras negativas en el periodo de un año fueron necesarias para considerarlo negativo.

E L I S A .- Basado en la técnica de Faith et al ⁽¹⁹⁶²⁾.

F R I g M- Los platos de microtítulo (NUNC- Denmark) fueron cubiertos con 50 microlitros (μ l) de una solución de Ig G de conejo (Sigma) (también se utilizó la Ig G humana de forma restringida para el F R I g M) a una concentración de 50 μ gr./ml de PBS. Tras incubar una hora a temperatura ambiente, los platos permanecieron una noche a 4 °C. Posteriormente fueron lavados tres veces con PBS (100 μ l.) añadiendo 75 μ l. de albúmina bovina al 1 % en PBS (Sigma) para bloquear la unión inespecífica. Tras una hora a temperatura ambiental se lava con PBS, depositando 50 μ l. de suero problema, por duplicado, diluido al 1/50 en PBS. Se incubaron tres horas a temperatura ambiente; después de lavar tres veces, se añadieron 50 μ l. de anti-Ig M humana (fragmentos F(ab')₂-conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma) diluida al 1/1000



en PBS-BS. Los platos permanecieron noventa minutos a temperatura ambiente, lavando posteriormente tres veces, añadiendo a continuación 50 μ l. de Nitrofenilfosfato (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml en Buffer Dietanolamina. La lectura se realizó tras 30 minutos de incubación a 37 °C en un lector BIO-TEC, a 405 nm.

En cada ensayo utilizamos un número aproximado de 32 pacientes con AR y 8 controles sanos, así como un estándar para F R Ig M (Behring) con diluciones progresivas para la construcción de la curva de valores. En cada lectura se ajustó el estándar a un nivel prefijado de absorbancia para disminuir las variaciones inter-ensayo.

OTROS F R - Se utilizó un ELISA similar, excepto que la antiglobulina específica (conjugada con fosfatasa alcalina) para cada F R, se utilizó a una dilución 1/1000 para el F R Ig G, y de 1/500 para el F R Ig A.

RESULTADOS- Se expresan en Unidades Internacionales para el F R Ig M (referidas al estándar empleado). En el caso de los F R Ig G e Ig A se expresan como unidades de absorbancia relativa a controles sanos según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Densidad Óptica del paciente}}{\text{Densidad óptica media de controles}}$$

Consideramos positivos los valores superiores a la media y dos desviaciones estándar.

TRATAMIENTO ESTADISTICO- Se utilizaron los siguientes test:

- * -t de Student
- * chi cuadrado
- * coeficiente de correlación de Pearson (paquete integrado SPSS).

R E S U L T A D O S

FACTOR REUMATOIDE POR LA TECNICA DE WAALER-ROSE-

75 (61%) de los pacientes con A R estudiados mostraron F R positivo (F R Ig M) por el test de Waaler-Rose, mientras que 47 (39%) fueron seronegativos. El porcentaje de seropositividad fue diferente según el sexo, oscilando entre el 82% de los varones y el 55% de las mujeres. La distribución por títulos se muestra en la Fig. 3.

FACTOR REUMATOIDE POR LA TECNICA DE ELISA

F R Ig M- El F R Ig M fue positivo en 104 de 122 pacientes estudiados (85%), y negativo en 18 (15%). Los niveles medios hallados en los casos de A R (2.83 ± 1.08) fueron más de 30 veces superiores que los de controles sanos (0.08 ± 0.05). Dos controles tuvieron cifras de F R Ig M por encima del límite establecido de normalidad, en ambos casos a título bajo.- (Fig. 4).

En 71 (96%) de los pacientes con Waaler-Rose previamente positivo y en 32 (68%) de los considerados seronegativos, se detectó F R Ig M, si bien los niveles medios del grupo con Waaler-Rose positivo fueron cinco veces superiores (Fig.4) Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Los resultados se resumen en la tabla 4.

Los títulos de F R Ig M por el test de Waaler-Rose y por ELISA muestran una correlación altamente significativa ($r = +0.58$; $p < 0.001$) (Fig.5).

Los resultados del F R Ig M, así como de otros F R determinados por ELISA en nuestro estudio, están basados en el empleo de Ig G de conejo unida a una superficie sólida. Hemos empleado, no obstante, la Ig G humana en varios experimentos con el F R Ig M, observando una elevada sensibilidad y especificidad tanto con Ig G de conejo como con Ig G humana, como se muestra a continuación:

- * Seropositividad con Ig G de conejo...85%
- * Seropositividad con Ig G humana.....84%
- * Resultados concordantes84%
- * Seronegatividad con ambas Ig.....6%

F R Ig G- A diferencia de los resultados obtenidos con el F R Ig M, con el F R Ig G se obtuvieron niveles más bajos, además de cierto solapamiento entre la población control (nivel medio: 0.96 ± 0.31) y los enfermos con A R (nivel medio 1.61 ± 0.56) (Fig.6). 64 pacientes diagnosticados de A R presentaron niveles elevados de F R Ig G (52%), y 58 fueron negativos (48%).

No encontramos correlación de este F R con el test de Waaler-Rose ($r=+0.08$), aunque los niveles medios aparecieron más elevados en los pacientes seropositivos por Waaler-Rose, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Fig7).

El porcentaje de individuos F R Ig G positivos fue superior en el grupo con Waaler-Rose positivo como se explica en la Tabla 4.

F R Ig A- El F R Ig A fue positivo en 82 pacientes (67%) y negativo en 40 (33%). Del mismo modo que para los F R Ig M e Ig G, hallamos elevadas concentraciones y un mayor porcentaje de positividades en los pacientes con Waaler-Rose positivo ($p < 0.001$) (Tabla 5, Fig. 8).

La mayoría de los pacientes con Waaler-Rose positivo tuvieron asimismo el F R Ig A positivo, representado de forma global por un coeficiente de correlación fuertemente positivo de $r=+0.48$ ($p < 0.001$) (Fig. 9).

* * *

Del total de la muestra de pacientes con A R estudiados (n=122), 45 (37%) fueron positivos para los tres F R investigados, mientras que sólo 7 (6%) fueron negativos para los F R Ig M, Ig G e Ig A. Tres pacientes presentaron sólo F R Ig A positivo, y ocho sólo el F R Ig G, como se muestra en la Fig.10. Observamos que la mayoría de los pacientes con F R Ig A y F R Ig G positivos tuvieron asimismo el F R Ig M positivo. Aplicamos la "r de Pearson" entre los F R, encontrando una correlación altamente significativa entre los niveles de F R Ig M y los de F R Ig A (Fig.11). El F R Ig G mostró una débil correlación con el F R Ig M, no significativa, y no se correlacionó con el F R Ig A, como muestra la Tabla 6.

F R Y SEXO

La prevalencia y concentraciones medias de los F R Ig M, Ig G e Ig A fueron estudiadas mediante ELISA en 29 varones y 93 mujeres. Los niveles medios de los tres F R alcanzaron cifras superiores en los varones, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para los F R Ig M e Ig A, pero no para el F R Ig G (Tablas 7A y 7B).

Como se describió en los resultados del F R por el test de Waaler-Rose, la prevalencia de casos seropositivos fue mayor en los varones (82%) que en las mujeres (55%).

Las diferencias entre los sexos no estuvieron justificadas por un mayor índice de actividad de la enfermedad.

F R Y AÑOS DE EVOLUCION DE LA A R

Los pacientes con A R fueron divididos en cuatro grupos atendiendo a los años de evolución de la enfermedad. No existió correlación con los F R Ig M, Ig G e Ig A, aunque los individuos con tiempo de evolución inferior a seis años presentaron mayores concentraciones de F R Ig A que los pacientes con A R de larga evolución ($\chi^2=4.65$, $p<0.05$).

F R Y PARAMETROS ANALITICOS

La prevalencia y concentraciones medias de los F R fueron estudiadas en los pacientes con ANA positivos (n=46) y negativos (n=63), observando que el primer grupo existieron mayores niveles de F R Ig M ($p < 0.05$). Los pacientes con ANA-positivos también tuvieron cifras más elevadas de F R Ig G e Ig A que los ANA-negativos (no significativos).

Al igual que los ANA, otros parámetros analíticos se relacionaron con los F R, tales como las cifras de Hemoglobina, leucocitos, plaquetas, albúmina, globulinas, ácido úrico y fosfatasa alcalina. Si bien el F R Ig G no se correlacionó con ninguno de los parámetros referidos, El F R Ig M se correlacionó con la cifra de plaquetas ($r = +0.25$, $p < 0.01$), y el F R Ig A con la cifra total de gammaglobulinas y globulinas beta ($r = +0.37$, $p < 0.001$).

F R Y ACTIVIDAD DE LA A R

Los cuatro grupos de pacientes clasificados según la actividad clínica de la enfermedad fueron relacionados con los niveles de F R Ig M, Ig G e Ig A, observando una significativa correlación entre F R Ig A por un lado e índice de Lansbury y velocidad de sedimentación por otro. El F R Ig G se correlacionó únicamente con la velocidad de sedimentación. La correlación de los valores de F R Ig M con los distintos índices de actividad de la A R no fue significativa. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Individualmente podía comprobarse la presencia de niveles elevados de algunos F R en pacientes en "remisión" clínica.

Por otro lado, en los pacientes con positividad para los tres F R no se objetivó un índice de actividad superior al hallado en el resto de los grupos.

F R Y MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES

Los F R fueron relacionados con la presencia de manifestaciones extraarticulares de la A R (Síndrome de Sjogren, nódulos subcutáneos y fibrosis pulmonar).

Los 41 pacientes con test de Schirmer positivo presentaron concentraciones de las tres clases de F R similares a los que tuvieron un test negativo. Tres pacientes con criterios de Síndrome de Sjogren, no obstante, mostraron niveles muy elevados de los F R Ig M e Ig A, pero no de F R Ig G.

La presencia de nódulos subcutáneos se asoció a niveles elevados de los FR Ig M e Ig A, pero no de F R Ig G.

En ocho pacientes etiquetados de fibrosis pulmonar se observaron concentraciones muy elevadas de F R Ig M cuando fueron comparados con el resto del grupo con A R. También estuvieron elevados los niveles de F R Ig A, no existiendo diferencias para el F R Ig G.

F R Y ESTADIOS RADIOLOGICO Y FUNCIONAL

Los F R-ELISA fueron analizados en relación con el estadio radiológico de los pacientes, no encontrando diferencias para las tres clases de F R.

Sólo en los pacientes con más de siete años de evolución se observó un incremento simultáneo de los F R Ig M e Ig A en relación con los estadios radiológicos III y IV ($\chi^2=5.7$, $p<0.05$). Considerando aisladamente cada uno de los F R, no pudimos evidenciar diferencias en sus concentraciones en relación con los estadios radiológicos.

No se observaron correlaciones entre F R y estadio funcional en las fases tempranas de la enfermedad. Sin embargo, el estudio selectivo de seis pacientes en estadios funcional IV y radiológico IV, demostró la presencia de concentraciones significativamente elevadas de los F R Ig M e

Ig A en todos los casos. En este grupo, los niveles de F R Ig G fueron similares a los del resto de casos con A R.

ASOCIACION DE FR CON OSTEOPOROSIS Y AMILOIDOSIS

64 pacientes con criterios de osteoporosis presentaron mayores niveles de F R Ig M que los pacientes sin osteoporosis (no significativo), no objetivándose diferencias para las restantes clases de F R.

El F R Ig M fue positivo en todos los casos de amiloidosis secundaria a la A R, mientras que los F R Ig A e Ig G fueron positivos en el 75% y 50% respectivamente.

F R Y PRONOSTICO

Valoramos la evolución clínica durante un año en 113 pacientes con A R, encontrando:

	nº	%
* mejoría clínica.....	19	(17%)
* estabilidad clínica.....	85	(75%)
* empeoramiento.....	9	(8 %)

La concentración media de los F R Ig M e Ig A al inicio del estudio fueron mayores en el grupo de pacientes que habían empeorado. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El estudio de la progresión radiológica a lo largo de un año fue analizada en 58 casos. En 25 pacientes (43%) se observó un incremento del número y/o tamaño de las erosiones, mientras que 33 (57%) permanecían estabilizados.

En el grupo que había desarrollado erosiones se apreciaron niveles más elevados de los F R Ig M e Ig A, tanto al inicio como al final del estudio, siendo ambas diferencias estadísticamente significativas (Tabla9). Por otro lado, la actividad clínica al final del estudio fue superior en el grupo con desarrollo de erosiones.

Comparamos las cifras de F R obtenidas al inicio del estudio con las determinadas un año después. Las tres clases de F R mostraron una significativa correlación, siendo ésta más intensa en el caso del F R Ig A (Tabla 10).

Además, el porcentaje de pacientes seropositivos para cualquiera de las tres clases de F R fue similar al inicio y al final del estudio (Tabla 11).

Tabla 3- F R Ig M-ELISA y Waaler-Rose

Waaler Rose	F R Ig M-ELISA		
	positivo	negativo	nivel medio
WAALER-R +	71 (96%)	3 (4%)	3.91 U I/ml*
WAALER-R -	32 (68%)	15 (32%)	0.76 U I/ml

* p<0.0001

Tabla 4- FR Ig G-ELISA y Waaler-Rose

	F R Ig G-ELISA		
	positivo	negativo	nivel medio
WAALER-R +	43 (58%)	31 (42%)	1.68 u. *
WAALER-R -	20 (42%)	27 (58%)	1.49 u.

* p<0.05

Tabla 5- F R Ig A-ELISA y Waaler-Rose

	F R Ig A-ELISA		
	positivo	negativo	nivel medio
WAALER-R +	62 (84%)	12 (16%)	2.78 u. *
WAALER-R -	19 (40%)	28 (60%)	1.53 u.

*p<0.001

Tabla 6- Correlaciones entre los F R-ELISA

	F R Ig M	F R Ig A
F R Ig A	+0.56 *	--
F R Ig G	+0.20 #	+0.10 #

(r de Pearson)

* p<0.001

N/S

Tabla 7 A- Porcentaje de F R- ELISA positivos y sexos

sexo	F R Ig M	F R Ig G	F R Ig A
VARONES	90 %	59 %	90 %
MUJERES	84 %	54 %	54 %

Tabla 7 B- Niveles medios de los F R-ELISA y sexos

sexo	F R Ig M nivel medio	F R Ig G nivel medio	F R Ig A nivel medio
VARONES	4.36 U.*	1.71 U.	3.67 U.**
MUJERES	2.16 U.	1.58 U.	1.88 U.

** p<0.0005

* p<0.0025

Tabla 8- F R-ELISA y actividad de la A R

F R	V S G	LANSBURY
F R Ig M	+0.15 N/S	+0.19 N/S
F R Ig G	+0.31 *	+0.12 N/S
F R Ig A	+0.29 *	+0.31 *

(r de Pearson)

* p<0.01

Tabla 9-

Progresión radiológica y concentraciones de F R

F R	progresión	no progresión
F R Ig M	5.02 u.	2.52 u. *
F R Ig G	1.49 u.	1.25 u.
F R Ig A	2.91 u	1.97 u *

* p<0.05

Tabla 10-

Correlación de las concentraciones de los F R al inicio y al final del estudio.

F R	r	p
F R Ig M	+0.60	p<0.001
F R Ig G	+0.45	p<0.001
F R Ig A	+0.86	p<0.001

Tabla 11-

Variaciones en los F R al inicio y al final del estudio

F R	Nº de casos con FR + al inicio	Nº de casos con FR + al inicio o al final
F R Ig M	104 (85%)	105 (86%)
F R Ig G	64 (52%)	69 (56%)
F R Ig A	82 (67%)	85 (69%)

Fig 3- Distribución de los títulos de Waaler-Rose en la serie de pacientes con A R y los controles sanos. Se consideró positivo un título superior a 1/16.

Fig. 3

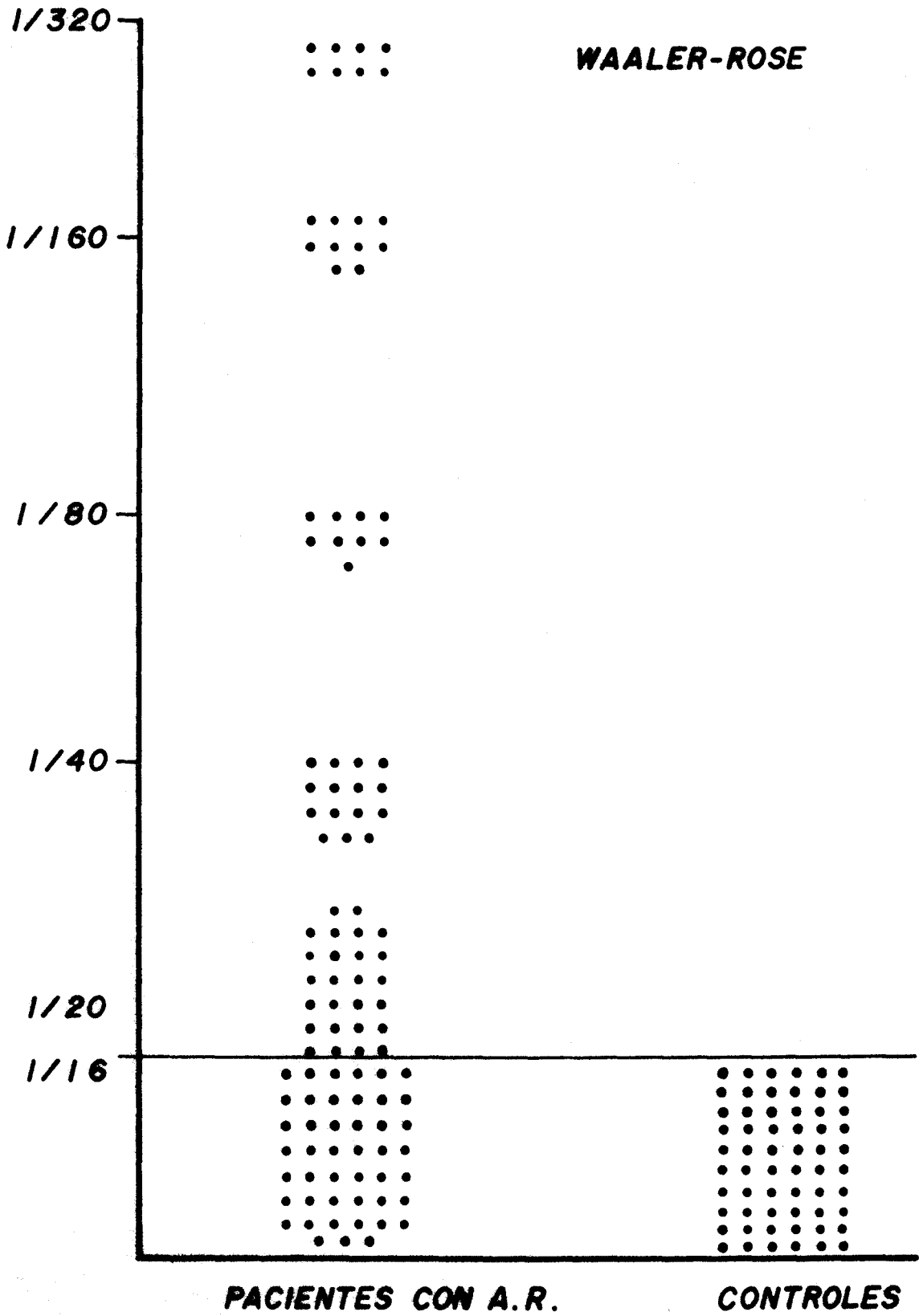


Fig 4- Distribución de las concentraciones del F R Ig M mediante ELISA en pacientes seropositivos y seronegativos por Waaler-Rose. En los casos seropositivos, los niveles medios fueron cinco veces superiores que en los seronegativos.

Fig. 4

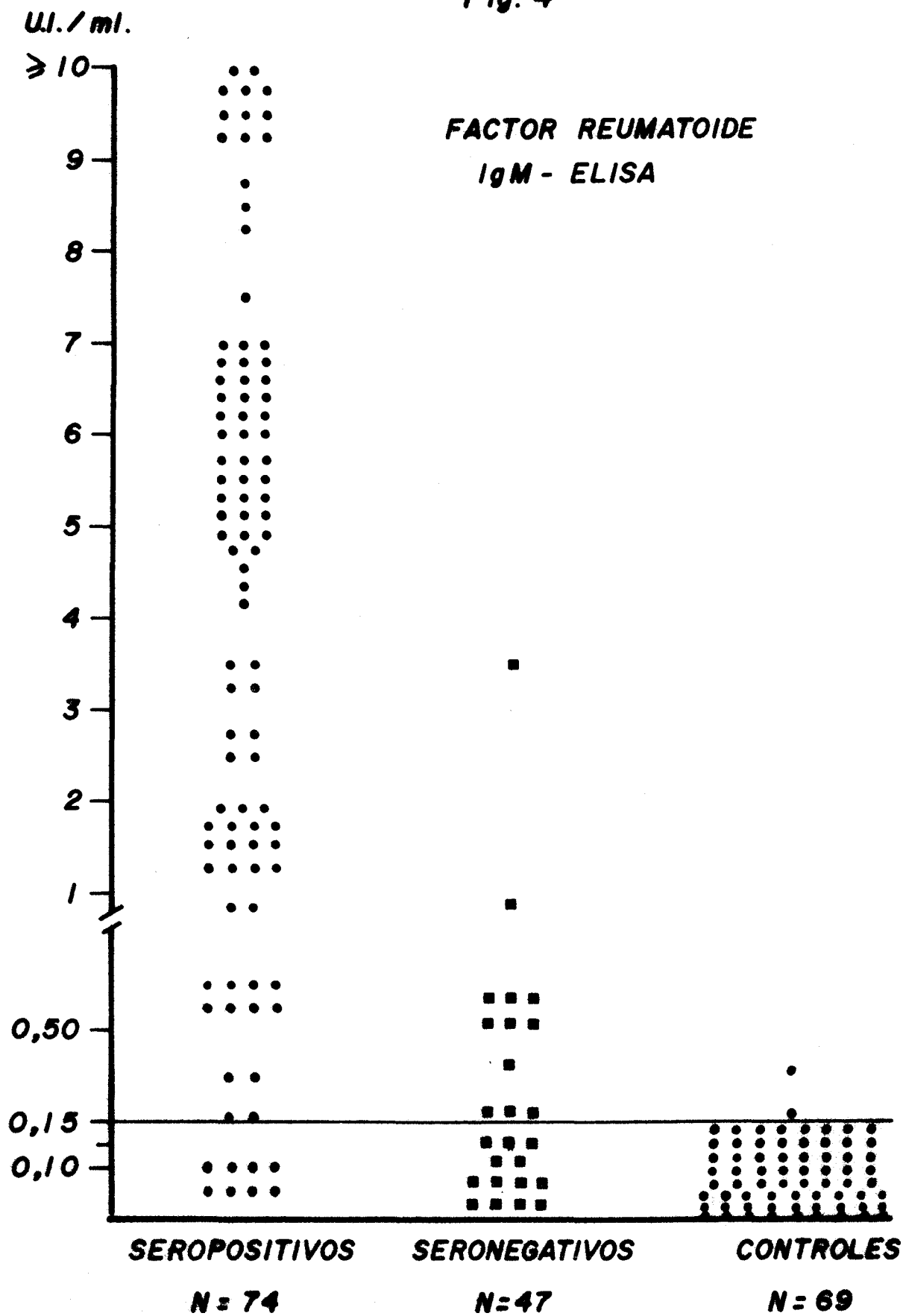
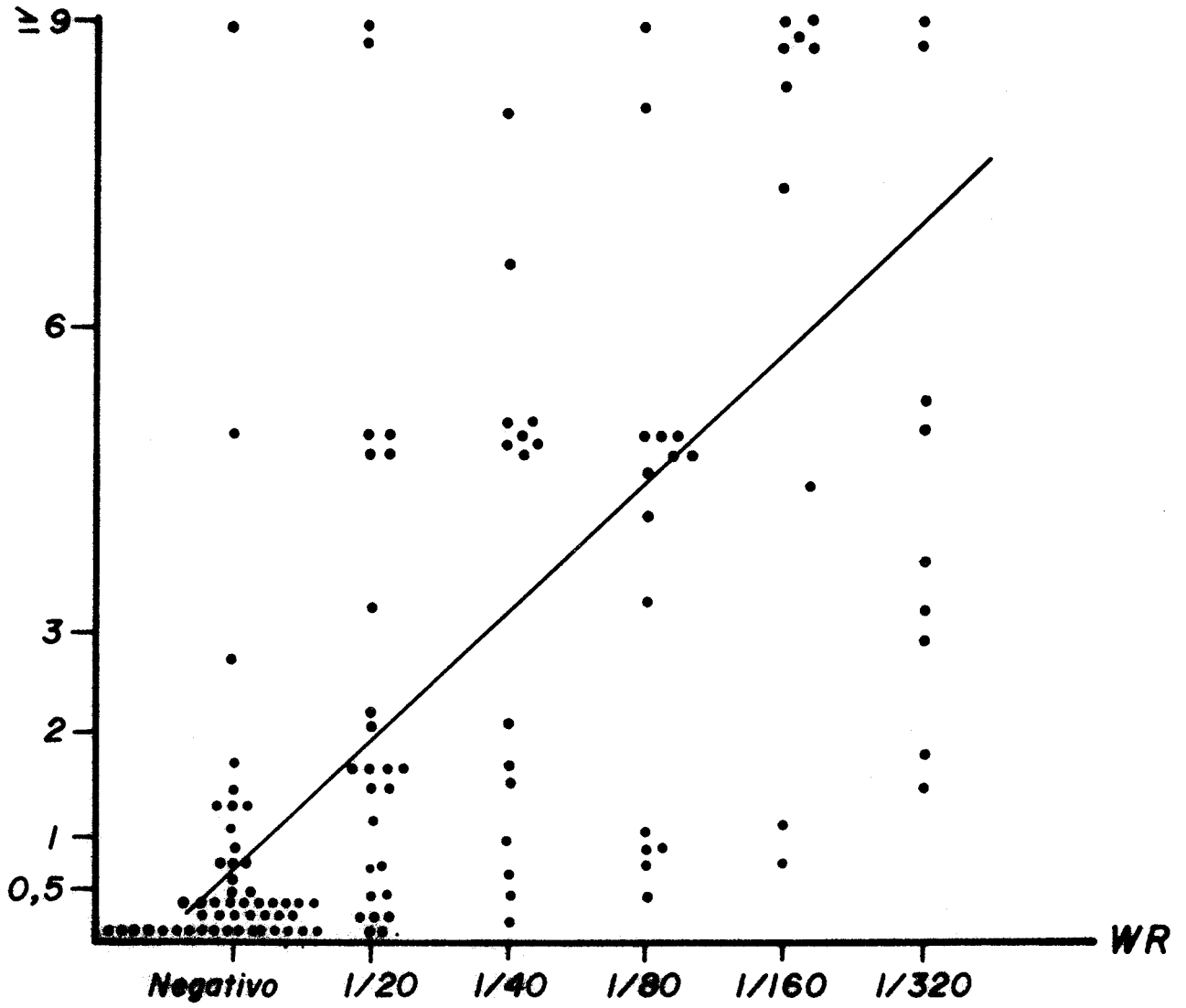


Fig 5- Correlación de los títulos de F R Ig M
obtenidos por el test de Waaler-Rose y
mediante ELISA.

Fig. 5

$r = + 0,58$
($p < 0,001$)

FR IgM UI/ml.



Comparación de los títulos obtenidos por Waaler-Rose y ELISA para el FR IgM.

Fig 6- Representación de las concentraciones de F R Ig M, Ig G e Ig A mediante ELISA en 122 pacientes con A R . El nivel de absorbancia óptica fue superior para los F R Ig M e Ig A.

Fig. 6

Absorbancia 405 nm.

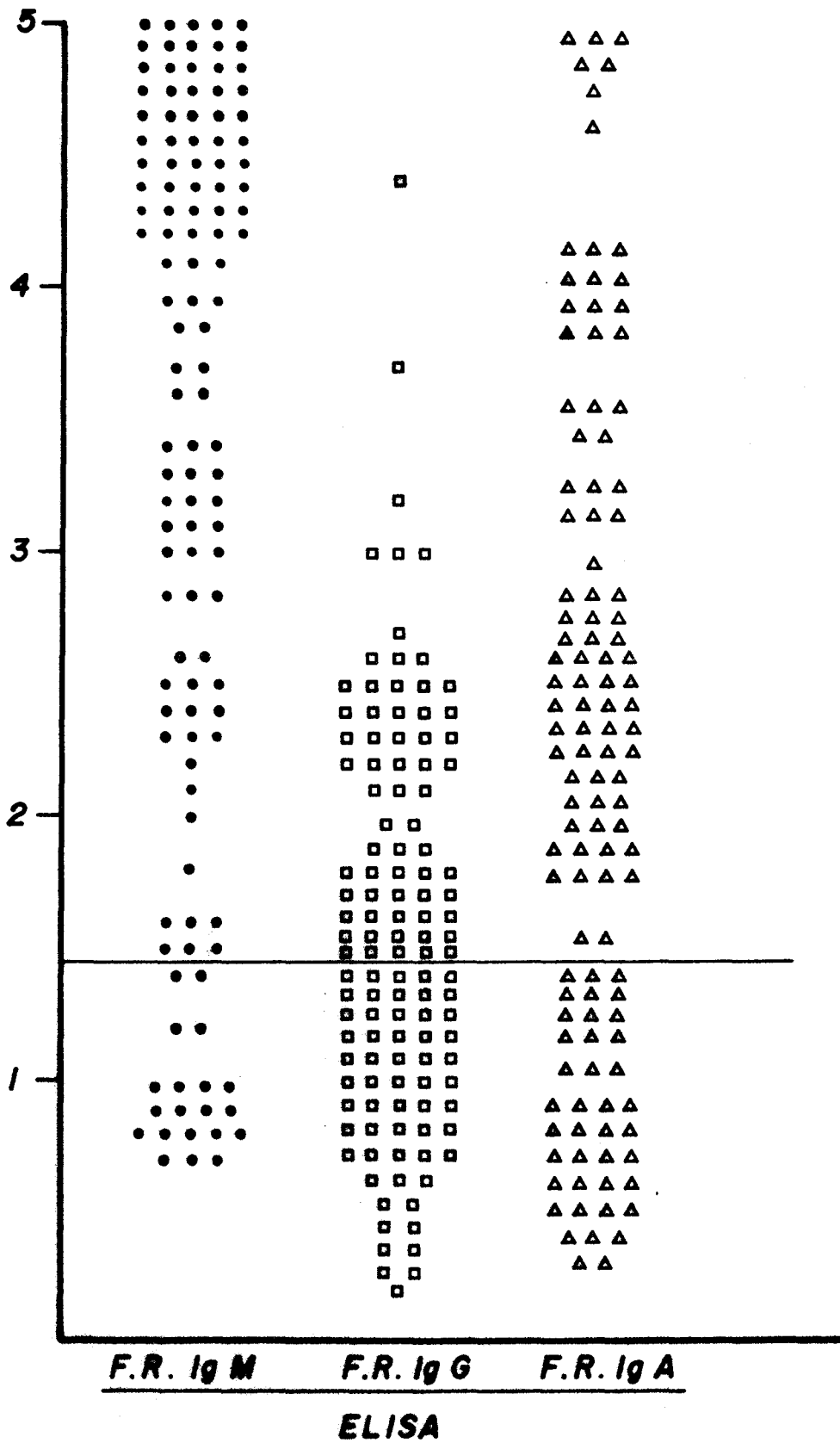


Fig 7- Distribución de las concentraciones de F R
Ig G en los pacientes seropositivos y serone-
gativos según el test de Waaler-Rose.

Absorbancia 405 nm

Fig. 7

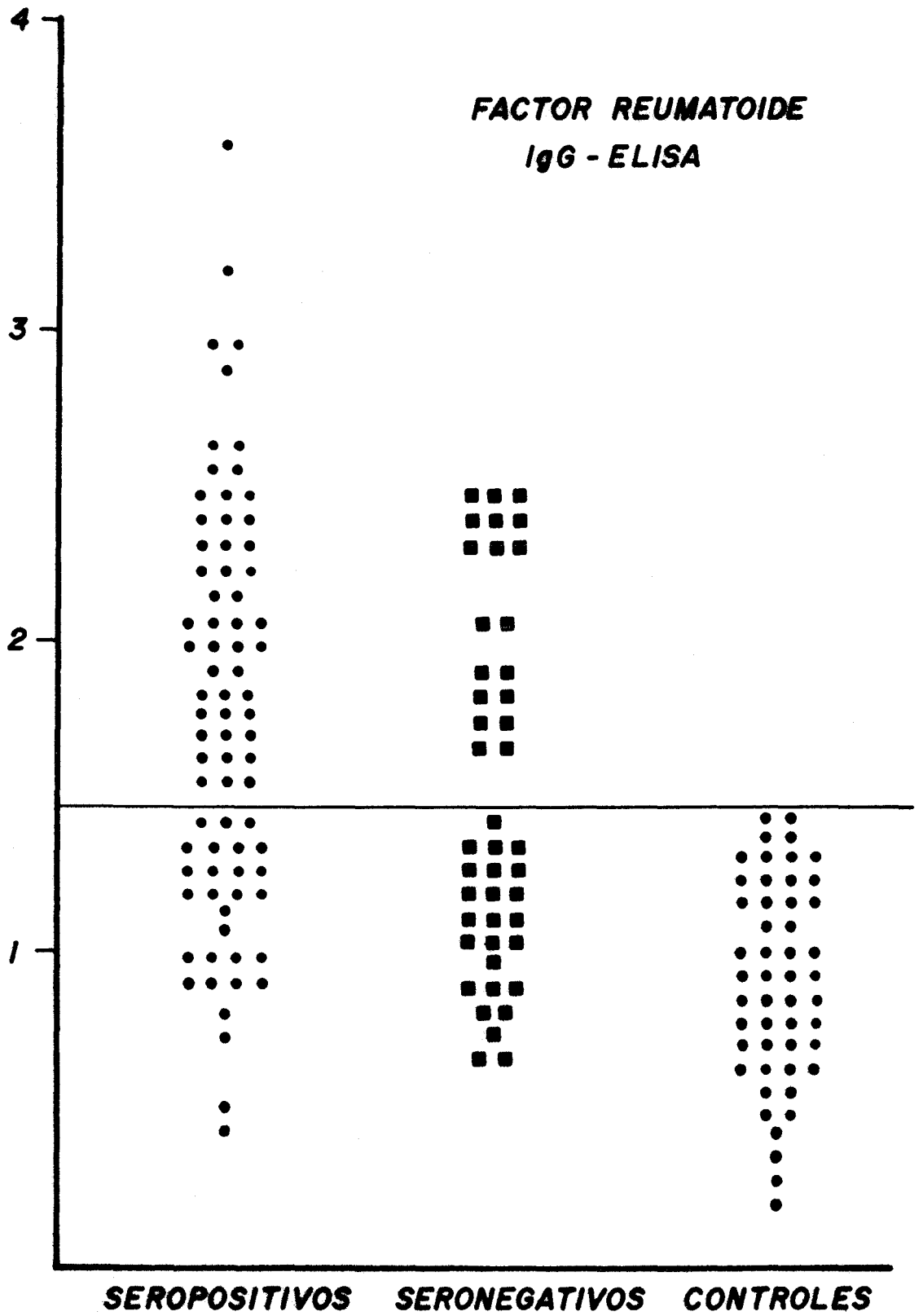


Fig 8- Distribución de las concentraciones de F R
Ig A en la A R en función del Waaler-Rose.



Absorbancia 405 nm

Fig. 8

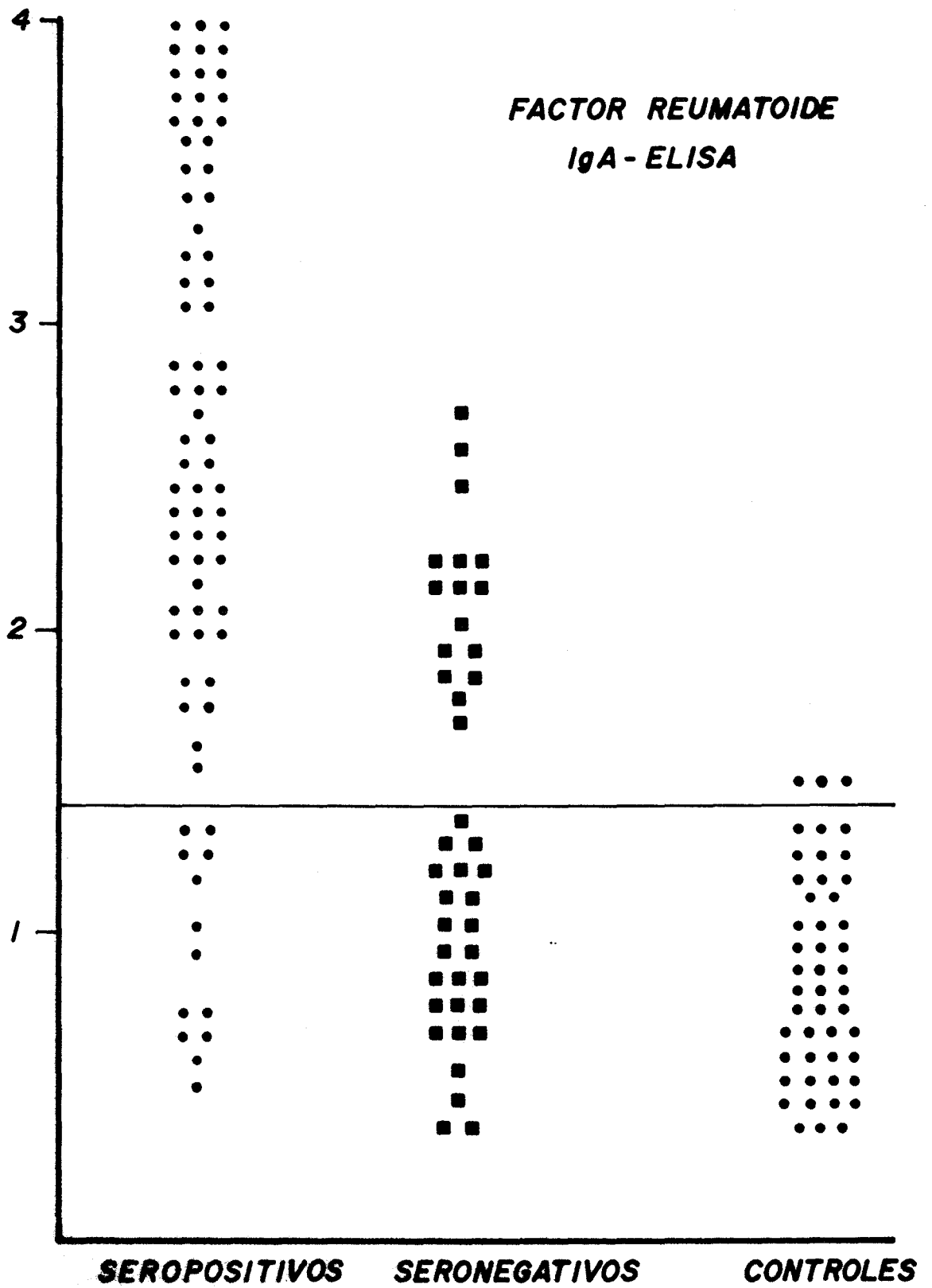
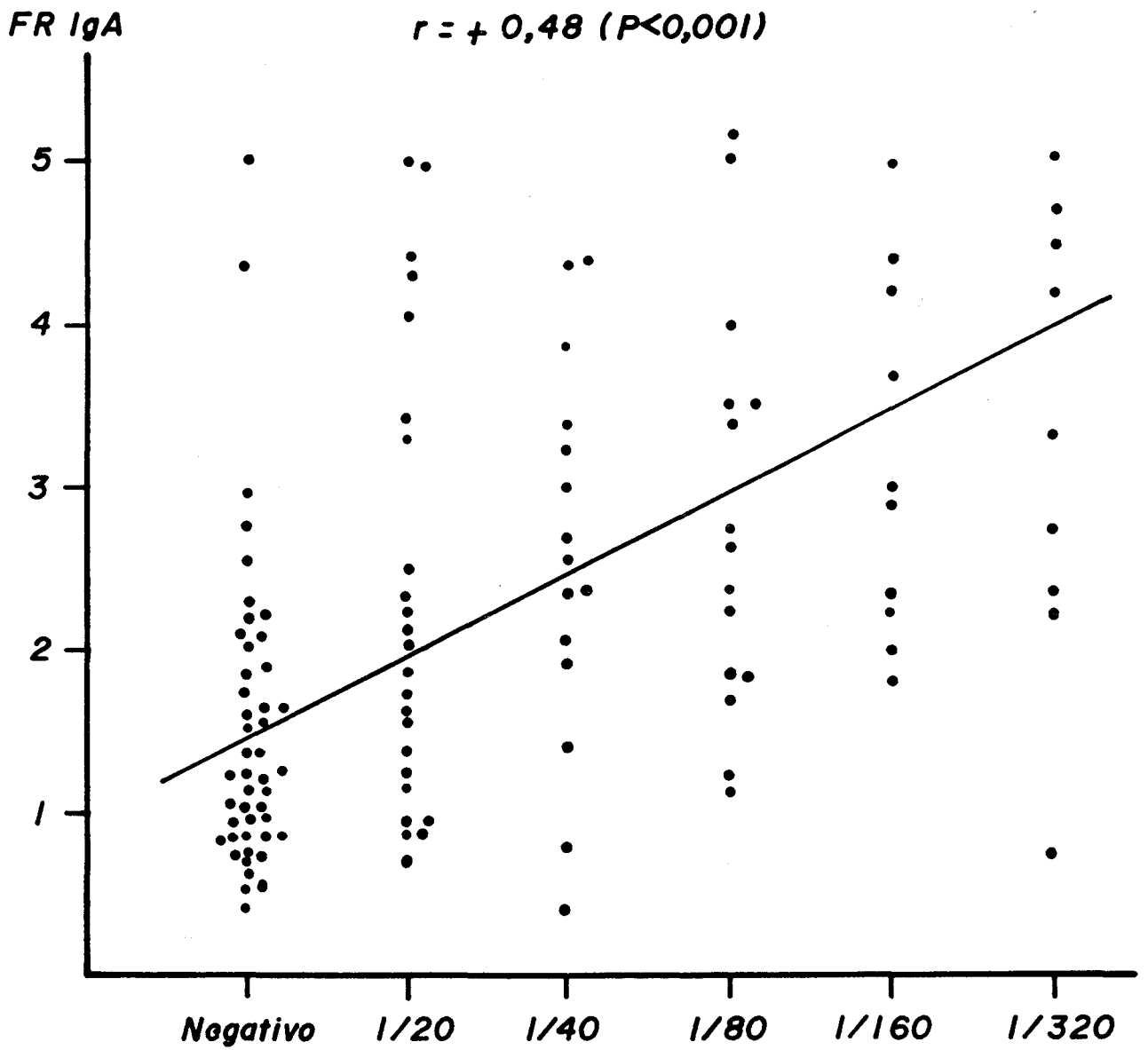


Fig 9- Correlación de los títulos de F R obtenidos mediante el Waaler-Rose y el F R Ig A-ELISA.

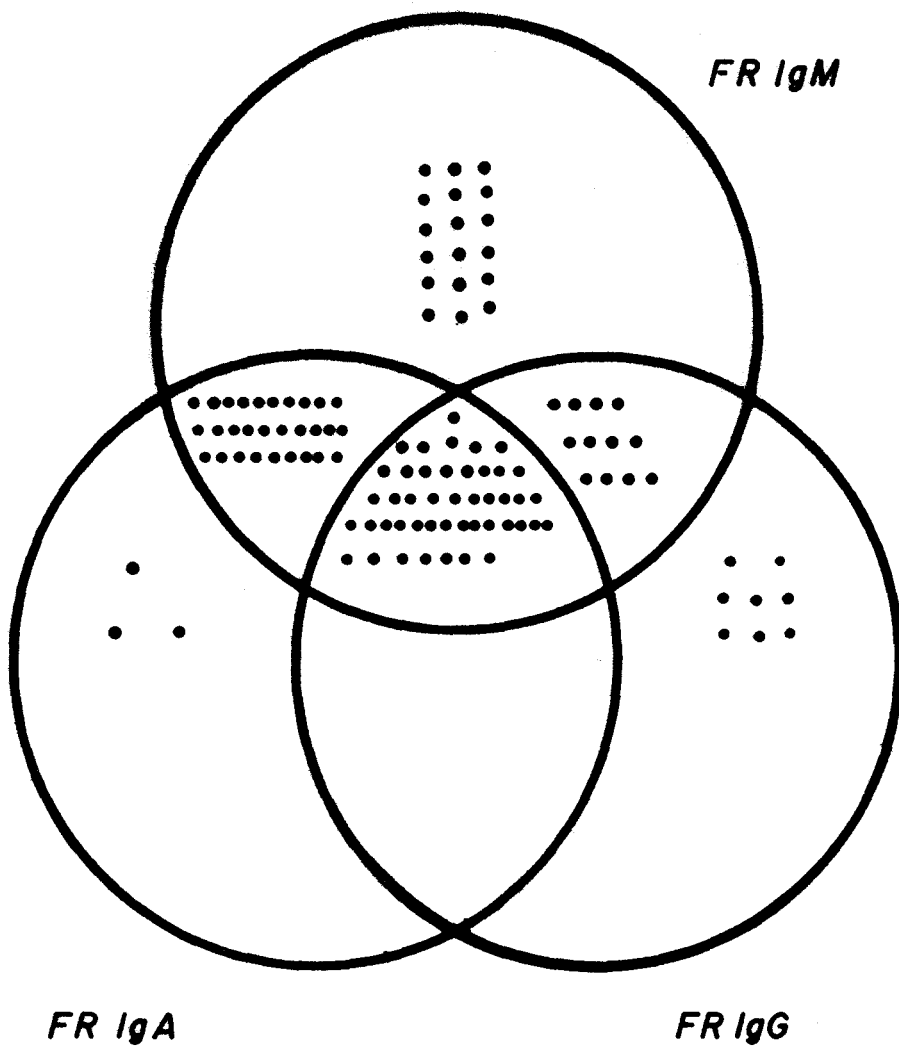
Fig. 9



Comparación de los títulos obtenidos para el FR IgA-ELISA, y el Waaler-Rose

Fig 10- Distribución de los pacientes con A R que presentaron F R positivos.

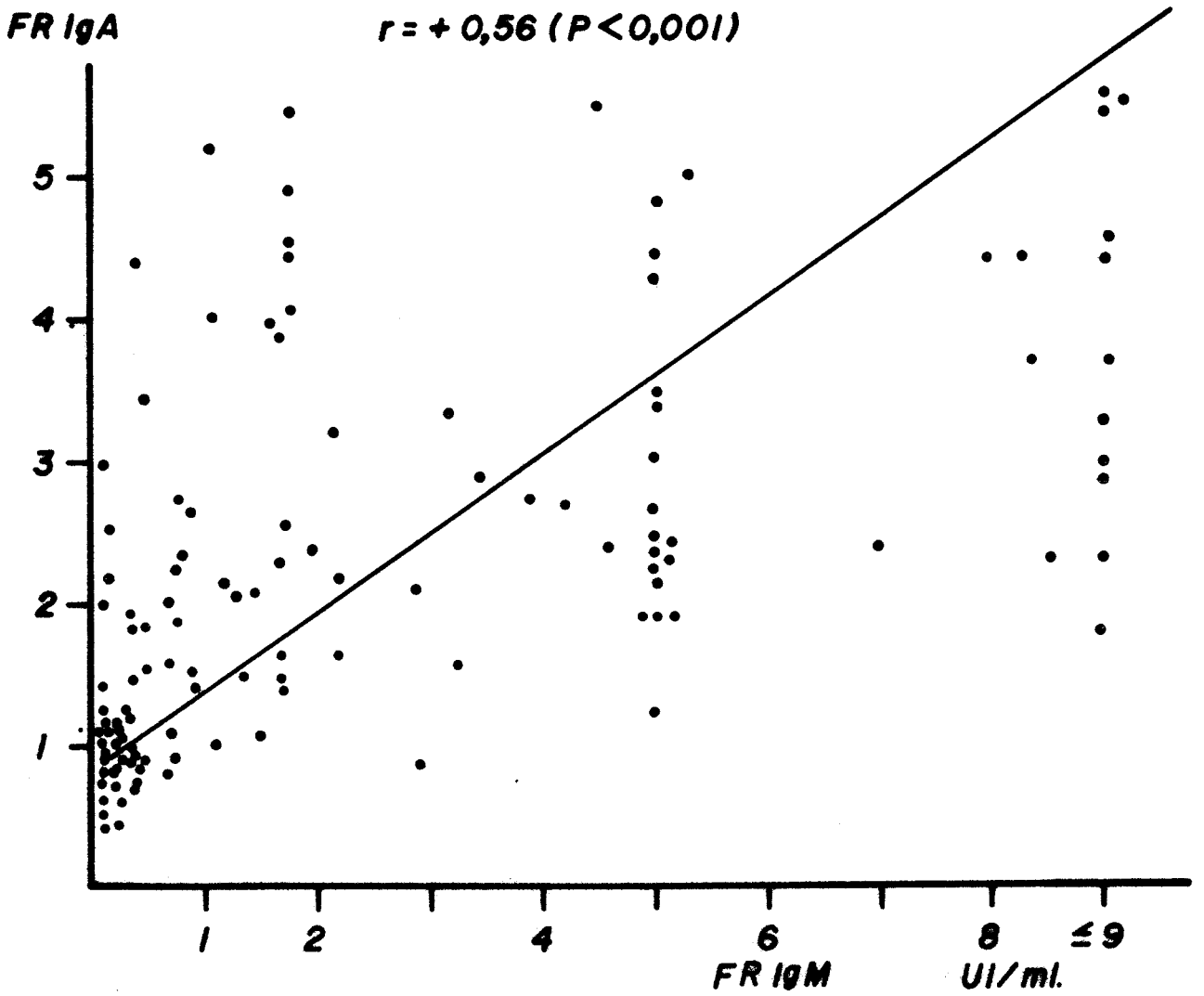
Fig.10



Incidencia y combinaciones de los diferentes FR ELISA.

Fig 11- Correlación entre los niveles del F R Ig M y el F R Ig A.

Fig. 11



Comparación de los títulos obtenidos por el FR IgM y el FR IgA

D I S C U S I O N

La cuantificación de los F R es importante en el diagnóstico y el pronóstico de la A R, especialmente cuando se encuentra a títulos elevados. Existen evidencias de que los F R contribuyen a la inmunopatogénesis de la A R, por ser los Ac predominantes que inician la formación de inmunocomplejos y la activación del complemento.

Aunque los tests de laboratorio usualmente detectan sólo el F R Ig M, los F R Ig G e Ig A parecen desarrollar un papel importante en la A R. La introducción de técnicas como el R I A y ELISA en la determinación de las diferentes clases de F R ha supuesto un importante avance en la comprensión del papel de estas antiglobulinas en la A R.

El presente estudio pretendió analizar la prevalencia y correlaciones clínicas de los F R Ig M, Ig G e Ig A en un grupo de pacientes con criterios de A R.

La mayoría de los tests de laboratorio utilizados para la determinación del F R cuantifican el F R Ig M, por su capacidad de aglutinar hematíes de carnero y partículas de látex o similares recubiertas con Ig G. Estos métodos son difíciles de cuantificar a títulos muy altos o muy bajos, y se describe una gran variabilidad de los títulos para un mismo suero entre diferentes laboratorios. Al mismo tiempo, no es posible cuantificar los F R Ig G e Ig A con estas técnicas. Resultados más objetivos se conocen con la Nefelometría, una variante de las técnicas de aglutinación.

En el grupo de pacientes con A R encontramos una prevalencia de seropositividad del 61% por el test de Waaler-Rose, cifra dentro de los límites hallados en otras series (85,133) (60-80%). Para el grupo de controles, existe el criterio general de aceptar hasta un 5% de falsos positivos.

En la muestra estudiada por nosotros, no encontramos falsos positivos para el test de Waaler-Rose.

El ELISA se describe en varios trabajos (41, 42, 43) como una técnica sensible, específica, rápida y simple para la determinación de los F R, pudiendo procesar un gran número de muestras con un equipamiento sencillo. Varias modalidades de ELISA para el estudio de los F R han sido propuestos en los últimos años, aunque todavía, salvo en casos aislados, no se emplean de forma rutinaria en los laboratorios.

Nosotros empleamos la técnica descrita por Faith et al en 1982 (42), con la que obtuvieron una significativa sensibilidad y especificidad, con un coeficiente de variación interensayo inferior al 10% y una correlación con el test de látex de 0.6.

Los platos de microtítulo (fase sólida) fueron cubiertos con Ig G de conejo, por ser simple y comparable al Waaler-Rose.

Stone et al (43) han comunicado que la división de la A R en seropositiva y seronegativa es ilógica, ya que empleando diferentes técnicas esta clasificación puede cambiar. Con la utilización de Ig G humana también se han obtenido resultados satisfactorios con el ELISA, por lo que en un experimento paralelo para el F R Ig M, empleamos Ig G humana unida a la fase sólida, observando una significativa concordancia con los resultados obtenidos con la Ig G de conejo. Sin embargo, el 16% de los pacientes tuvieron valores discordantes entre ambas Ig. Por otro lado, se ha encontrado negativo para ambas sólo en el 6%.

Estos datos refuerzan la idea de que utilizando ambos métodos para la cuantificación de los F R por la técnica de ELISA, el porcentaje de pacientes seronegativos se reducirá sensiblemente (47).

En los pasos de lavado realizados en la técnica ELISA se pueden remover las proteínas no ligadas, pero también F R de baja constante de asociación. Esta teórica desventaja no parece tener repercusiones prácticas, ya que los resultados son equiparables a los obtenidos con otras técnicas^(135, 136).

El F R Ig M se ha demostrado que es capaz de interferir en la cuantificación del F R Ig G, pudiendo unirse a la Ig G en fase sólida y a la Ig G sérica, dando de este modo falsos positivos para el F R Ig G. Además, la Ig G en forma de agregados puede provocar uniones inespecíficas con la mencionada Ig G adherida a una fase sólida.

Para evitar falsas determinaciones del F R Ig G se han sugerido varios tratamientos del suero, incluyendo reducción y alquilación y el uso de pepsina. El tratamiento con pepsina ha sido el más ampliamente utilizado en los últimos años, ya que al destruir el F R Ig M no interfiere, al menos teóricamente, en la cuantificación del F R Ig G. Faith et al⁽¹³⁷⁾, por otro lado, observaron un descenso del 40% en los niveles de F R Ig G tras tratamiento con pepsina, mientras que el empleo de los fragmentos F(ab')₂ de Ig G como Ac conjugado producía mínimas uniones inespecíficas y, por tanto, podría evitar el tratamiento con pepsina. Por último, Stone et al⁽¹³⁸⁾ proponen que debe omitirse este paso si el objetivo es conseguir un ELISA simple, rápido y reproducible. Nosotros hemos utilizado los fragmentos F(ab')₂ de Ig G, evitando el tratamiento con pepsina, obteniendo para el F R Ig G unos resultados similares a otros autores^(135, 136), lo que nos ha llevado a sospechar que el método de ELISA para el F R Ig G fue adecuado.

La expresión de los resultados de ELISA ha sido tema debatido en la literatura. Con frecuencia, el valor obtenido por absorbancia óptica se ha utilizado como relación de una muestra dada a las negativas de referencia, o bien como suma

de absorbancias a dos o tres diluciones diferentes. Algunos autores (Koopman 1980⁽⁷²⁾, Faith 1982⁽⁸²⁾) expresan los resultados en $\mu\text{g/ml}$ de . Puede sin embargo ser más significativo expresar el F R como actividad Ac con referencia a un estándar internacional (en la actualidad disponible para el F R Ig M).

En nuestro caso, utilizamos un estándar de referencia para cuantificar el F R Ig M, y la absorbancia relativa a la de las muestras de controles para los F R Ig G e Ig A. Creemos que esta modalidad de expresión de los resultados es satisfactoria, al igual que han reflejado otras publicaciones recientes^(44, 83).

El grupo de pacientes con AR incluidos estuvo formado por 29 varones y 93 mujeres, con una relación 1:3 similar a las descritas previamente. Aunque todos los pacientes tenían A R definida, no podemos sin embargo considerar homogéneo nuestro grupo, debido a las características radiológicas y tiempo de evolución de la enfermedad. Nos ha llamado no obstante la atención la baja prevalencia de signos de Vasculitis reumatoide y de Síndrome de Felty en esta serie.

Si bien otros autores⁽¹³⁴⁾ han comunicado la presencia de ANA hasta en un 74% de los casos con A R, en nuestro grupo hemos encontrado un 42% de ANA positivos, perteneciendo en dos terceras partes de los casos al patrón homogéneo difuso. No obstante, la evaluación de estos hechos y de sus posibles implicaciones, no forman parte de los objetivos del presente trabajo.

La técnica de ELISA delimita claramente las concentraciones de F R Ig M que se encuentran en pacientes con A R y controles sanos, lo que confirma su sensibilidad para la cuantificación de este F R.

En nuestra serie, un 85% de los individuos con A R fueron seropositivos para el F R Ig M, valor comparable con

los hallazgos de otros autores (32,41,145), que oscilan entre el 84% y el 93%.

Un punto de interés del método ELISA consiste en la evaluación de los pacientes con Waaler-Rose u otro test de aglutinación negativo. Varios autores (25,133) han encontrado cifras del 30%-55%, mientras que en nuestro estudio ha sido del 68%. Confirmamos, por tanto, la mayor sensibilidad del ELISA en relación al test de Waaler-Rose.

En cuanto a la correlación entre títulos de Waaler-Rose y concentraciones del F R Ig M mediante ELISA, Willems et al (79) y Maiolini et al (78) observaron una $r=+0.85$, mientras que Faith et al (82) de 0.6, y Stone et al (85) de 0.58. Nosotros hemos obtenido una correlación altamente significativa ($r=0.58$), aunque en tres pacientes con Waaler-Rose positivo, el F R Ig M-ELISA fue negativo, una discordancia inferior al 5% referida en algunos trabajos (23,85).

La prevalencia del F R Ig G en pacientes con A R, según diversos autores (132,142) se sitúa entre el 40% y 50%, siendo del 52% en nuestra serie. El F R Ig G ha sido descrito en la población sana (37,69), endocarditis infecciosa (134) y en casos aislados en otras enfermedades reumáticas (131).

El significado de los niveles elevados de F R Ig G en la A R no es bien conocido. Si bien las primeras publicaciones (37,143) sugirieron que el F R Ig G estaba significativamente elevado tanto en pacientes seropositivos como seronegativos, posteriormente se ha reconocido (27,139) que los títulos son mucho más bajos en los casos seronegativos. Similares observaciones hemos realizado en nuestra serie, aunque las diferencias fueron menos significativas que para los F R Ig M e Ig A.

Las comunicaciones sobre la correlación entre F R IgG y Waaler-Rose han sido controvertidas (41,85,141). Nuestros resultados mostraron que no existió correlación entre el F R

Ig G y el F R Ig M, determinado tanto por Waaler-Rose como por ELISA.

Si bien el F R Ig G ha sido relacionado con la patogénesis de la A R al ser sintetizado en la sinovial rematoide tanto de pacientes seropositivos como seronegativos (37,133), la discordancia que se observa con las concentraciones de F R Ig M pone de manifiesto interrogantes sobre el papel que ambos F R desarrollan en la etiopatogenia de la A R.

Se ha encontrado con frecuencia solapamiento de las concentraciones de F R Ig G entre los pacientes con A R y los controles (44,66,143), resultados que también se han producido en nuestra serie. Este hecho contrasta con las grandes diferencias observadas en ambos grupos para los F R Ig M e Ig A.

La presencia de valores medios para el F R Ig G inferiores a los de otros F R, unido al solapamiento con los controles sanos, podrían reforzar la idea de que el F R Ig G tiene menos importancia diagnóstica que los F R Ig M e Ig A.

El F R Ig A ha sido detectado en el suero de pacientes con A R alrededor del 60%-70% en trabajos previos (44,143,145). En nuestro estudio, un 67% de los casos presentó niveles elevados, además de un 3% de los controles, como han referido otros autores (66,45).

Nuestros resultados muestran que la mayoría de los pacientes con F R Ig A positivo fueron seropositivos para el F R Ig M, tanto por Waaler-Rose como por la técnica de ELISA. Esta significativa correlación, mencionada también por otros autores (108,144,145), ha llevado a discusión sobre el papel etiopatogénico del F R Ig A.

Se ha descrito que el F R Ig A en forma polimérica puede causar reacciones de aglutinación (40). Si bien el potencial patogénico del F R Ig A no es bien conocido, se ha observado que la persistencia de Ac Ig A anti - Yersinia tras

infección con este agente se asocia con el desarrollo de artritis reactiva.

La presencia de F R Ig A en la A R podría reflejar en cierto modo la participación de las células T en el proceso patogénico, ya que la generación de Ac Ig A es más dependiente de células T cooperadoras que la producción de los F R Ig M e Ig G .

Es posible que su significado en el contexto clínico de la A R pueda ser independiente de la correlación con el F R Ig M, como así lo sugieren el papel en la actividad-inflamatoria, el desarrollo de erosiones ⁽¹⁴⁴⁾ y el Síndrome de Sjogren ^(44, 147) .

Un tercio de los pacientes incluidos en el estudio fueron positivos para los F R Ig M, Ig G e Ig A, mientras que en siete casos ningún F R alcanzó valores significativos. Es de interés la observación de las características clínicas de este último subgrupo; la mayoría de los casos presentaron clínica y radiología indistinguibles del resto de pacientes con A R.

Encontramos una significativa diferencia entre los sexos para los tres F R. La asociación de niveles elevados de F R Ig M, F R Ig G y F R Ig A en los varones no parece haber sido comunicada previamente ⁽⁴⁴⁾. Por otro lado, no encontramos diferencias en el índice medio de actividad de la enfermedad entre los varones y las hembras, ni en las características clínico-radiológicas de ambos grupos.

La A R es más frecuente en el sexo femenino, y clasicamente se ha resaltado el papel del factor hormonal en la etiopatogenia de la enfermedad. Desconocemos las razones de estas elevadas concentraciones de las tres clases de F R en los varones en comparación con las mujeres.

La A R se incluye en muchos tratados como enfermedad autoinmune en base a los trastornos que existen en la inmunidad humoral y celular. La presencia de ANA en pacientes con A R se ha relacionado basicamente con la presencia de vasculitis reumatoide (136). Si bien no hemos observado en nuestra serie correlación con patrones clínicos ó radiológicos particulares, los pacientes con ANA positivos presentaron mayores niveles de los tres F R estudiados, especialmente del F R Ig M.

En el manejo clínico de la A R ha tenido gran interés la investigación de parámetros objetivos que pudiesen reflejar la actividad inflamatoria en un momento dado. Clasicamente se obtiene un índice articular (170) sujeto a variaciones interobservador, ó bien se valora la actividad de la enfermedad mediante la velocidad de sedimentación. Aunque esta última es simple y objetiva, a menudo presenta dificultades de interpretación en pacientes individuales.

Varios autores (44, 137) han comunicado resultados controvertidos sobre la relación entre actividad de la enfermedad y el F R Ig M, mientras que otros han observado una correlación con los F R Ig G (137, 141, 152) e Ig A (44, 142). Nuestro estudio hace hincapié en el valor clínico de cuantificar isotipos individuales de F R, por su correlación con la actividad clínica. Los resultados muestran que mientras el F R Ig M se correlaciona debilmente con la actividad inflamatoria, los F R Ig G e Ig A alcanzaron una moderada correlación, en especial el F R Ig A. Diversas explicaciones se han ofrecido sobre la relación entre F R Ig A y actividad de la enfermedad, desde su permanencia en la circulación durante un mayor período de tiempo que otros F R, quizá por ser inefectivo en activar el complemento y la fagocitosis.

Por último, nos ha llamado la atención la existencia de cierto número de pacientes en remisión completa y

concentraciones muy elevadas de los F R Ig M e Ig A.

En relación a las manifestaciones extraarticulares de la A R, numerosos trabajos sobre la vasculitis reumatoide han concedido un papel más importante a la presencia de niveles elevados de F R Ig G (131, 135, 137), y menos a los de F R Ig M (137) o Ig A (141). Elkon et al (147) observaron una prevalencia de los F R Ig M e Ig A en el Síndrome de Sjogren superior al 75%, destacando que el FR Ig A se encontró fundamentalmente en la forma polimérica, sugiriendo un posible origen en las mucosas. En nuestro grupo hemos observado niveles elevados de F R Ig M en los pacientes con fibrosis pulmonar, y de los F R Ig M e Ig A en un pequeño número de casos de Síndrome de Sjogren secundario.

En una comunicación reciente (149) se afirmaba que los pacientes con amiloidosis secundaria eran en gran número seronegativos, concediendo un papel protector al F R. Los cuatro pacientes de nuestra serie diagnosticados de amiloidosis presentaron niveles elevados de F R Ig M. Probablemente, el desarrollo de esta complicación de la A R no esté bajo la influencia del F R, sino en relación con las características clínicas y tiempo de evolución de la enfermedad.

La presencia de osteoporosis se asoció en nuestro estudio con niveles elevados de F R Ig M, aunque la relación de éste último probablemente sea indirecta.

De gran interés en el estudio de las distintas clases de F R ha sido determinar la respuesta ante diversos tratamientos utilizados en la A R. Se ha comunicado (144, 145) que los pacientes con tratamiento "de fondo" experimentan un moderado descenso en los niveles de F R Ig M. La mayoría de estos trabajos se realizaron en pacientes que iniciaban tratamientos con sales de oro y padecían A R "de comienzo".

Si bien la serie de pacientes con A R incluidos en este trabajo fue heterogénea en cuanto a tiempo de evolución e inicio de tratamientos "de fondo", realizamos un estudio comparado entre los casos que habían recibido en el último año sólo antiinflamatorios no esteroideos y los que habían recibido tratamiento "de fondo" con sales de oro ó d-penicilamina. Aunque en algunos casos los niveles de F R descendieron, en otros aumentaron. En resumen, no encontramos diferencias entre ambos grupos para las tres clases de F R.

Se desconoce con exactitud el mecanismo de acción de muchos tratamientos utilizados en la A R. Como previamente se ha descrito, existe un número no despreciable de pacientes en remisión clínica y títulos elevados de algunos F R. Por otro lado, también hemos observado una apreciable estabilidad de los F R en relación al tiempo de evolución de la A R, y comparando los valores obtenidos al inicio del estudio y un año después. Estas observaciones podrían ir en contra de que el mecanismo por el que alguno de los tratamientos "de fondo" mejoran la A R sea la disminución de la concentración de F R Ig M.

La relación entre los F R y el estadio radiológico es una tarea complicada, ya que la progresión radiológica está íntimamente relacionada con el tiempo de evolución de la A R y la muestra estudiada fue muy heterogénea. Clásicamente ha sido el F R Ig M el "marcador" clínico de un pronóstico desfavorable. Sin embargo, hoy día se concede un gran interés al F R Ig A en el pronóstico. En nuestro estudio no se apreciaron diferencias entre las cuatro categorías radiológicas para ningún F R. Cuando se analizaron el F R Ig M e Ig A asociados, encontramos un porcentaje superior al esperado de pacientes en estadios III y IV.

* * *

Resultados similares fueron obtenidos con el estadio funcional, aunque el análisis selectivo de seis pacientes en estadios radiológico y funcional IV (terminal) mostró la existencia de F R Ig M y F R Ig A a títulos muy elevados. El papel pronóstico, por tanto, de estos FR, puede ser importante cuando se encuentran asociados. El F R Ig G no estuvo relacionado con un pronóstico desfavorable.

Highton et al⁽¹⁴⁵⁾ publicaron que el F R Ig A, aunque fue relativamente específico de padecer A R, no supera en especificidad diagnóstica al F R Ig M. Creemos que el F R Ig M juega un papel central en el diagnóstico de la AR, superior al de otros F R.

La A R puede tener un amplio espectro clínico, desde un brote artrítico limitado hasta el desarrollo de una enfermedad progresiva con complicaciones sistémicas. Es importante una identificación precoz de los pacientes con peor pronóstico, ya que existen evidencias de que un tratamiento "de fondo" puede ser más efectivo si se instaura en la fase temprana de la enfermedad. Algunos investigadores han estudiado de forma prospectiva a pacientes con A R "de comienzo" a fin de identificar factores de importancia pronóstica.

De modo general, parece aceptado que un título elevado de F R por las técnicas de aglutinación implica un peor pronóstico. Teittson et al⁽¹⁴⁴⁾, en un estudio prospectivo de 33 pacientes con A R temprana, han comunicado que el grupo de pacientes con elevados niveles de F R Ig A desarrolló mayor número de erosiones, necesitando asimismo tratamientos más agresivos, lo cual sugiere que el F R Ig A puede ser un factor que nos ayude a decidir el momento de iniciar un tratamiento "de fondo" en pacientes individuales. Sorprendentemente, este autor no observó asociación entre elevadas concentraciones de F R Ig M y mal pronóstico. Highton et al⁽¹⁴⁵⁾ manifestaron

posteriormente, en un nuevo estudio prospectivo, que el F R Ig A está relacionado indirectamente con el pronóstico, en virtud de su correlación con el F R Ig M. En resumen, varios estudios prospectivos (144, 141) asocian el F R Ig A con el desarrollo temprano de erosiones en el curso de la A R. Estos autores conceden mayor importancia a la presencia de F R Ig A a títulos elevados, que al F R Ig M.

En nuestro estudio, los niveles elevados tanto de F R Ig M como de Ig A, se asociaron con el desarrollo de erosiones, no existiendo tal asociación para el F R Ig G. Si bien el grupo estudiado tenía una evolución media de la A R de 9 años, la asociación de los F R Ig M e Ig A con un peor pronóstico es aplicable a los pacientes con A R "temprana", ya que, como se ha mencionado previamente, las concentraciones de los diferentes F R no parecen tener variaciones significativas a lo largo de la evolución. Sugerimos que tanto el F R Ig A como el F R Ig M pueden ser marcadores precoces del desarrollo de erosiones en la A R, quizá justificando un tratamiento temprano con sales de oro ó d-penicilamina.

En el análisis prospectivo de nuestra serie de pacientes con A R, encontramos fuerte correlación para los niveles de F R Ig A al inicio y al final del estudio. Los F R Ig M e Ig G también ofrecieron una correlación estadísticamente significativa.

Teniendo en cuenta que en nuestro estudio ha sido el F R Ig A el más estable con respecto al tiempo de evolución y el que obtuvo una mejor correlación con la actividad clínica, debe concederse una gran importancia a su determinación, máxime si añadimos el papel que juega en el pronóstico de la A R.

Por último, la técnica de ELISA, por sus especiales características, creemos que debe introducirse en la determinación de rutina de los F R.

C O N C L U S I O N E S

1) Encontramos un 61% de pacientes con A R y test de Waaler-Rose positivo, frente a un 85% hallado mediante ELISA.

2) Cuando un suero se analiza para el F R Ig M mediante ELISA utilizando como substrato Ig G humana e Ig G de conejo, la sensibilidad se incrementa, encontrándose resultados positivos hasta en el 94% de los pacientes con A R.

3) En la actualidad la técnica de ELISA es, por su sensibilidad, el método de elección para la cuantificación del F R Ig M.

4) Fueron observados niveles elevados de los F R Ig G e Ig A en el 52% y 67% respectivamente.

5) Las concentraciones del F R Ig A se correlacionan con las de F R Ig M. No existió correlación entre el F R Ig G y los F R Ig M e Ig A.

6) Los varones presentan niveles medios de F R Ig M, F R Ig G y F R Ig A significativamente superiores que las mujeres, sin que podamos explicar la causa de este hallazgo.

7) Los pacientes con A R que desarrollaron manifestaciones extraarticulares (nódulos reumatoides, fibrosis pulmonar o Síndrome de Sjogren) presentaron concentraciones elevadas de los F R Ig M e Ig A, pero no del F R Ig G.

8) El F R Ig A y el F R Ig G se correlacionan con la actividad de la enfermedad, mientras que tal asociación no es significativa en el caso del F R Ig M.



9) En pacientes aislados, la determinación de los niveles de F R Ig G e Ig A no es un parámetro definitivo para valorar la actividad de la A R.

10) Si bien el F R Ig G se correlaciona con la actividad de la enfermedad, no está asociado con los parámetros funcionales y radiológicos de la A R ni con las manifestaciones extra-articulares estudiadas.

11) Las concentraciones de las tres clases de F R investigadas tienden a mantenerse estables en el curso de la enfermedad y, especialmente, el F R Ig A.

12) Los pacientes que desarrollaron erosiones durante el período de seguimiento tuvieron mayores niveles de los F R Ig M e Ig A que el grupo con estabilidad radiológica, tanto al inicio como al final del estudio. Concluimos que las concentraciones elevadas de los F R Ig M e Ig A implican un peor pronóstico clínico y radiológico.

RESUMEN

La Artritis Reumatoide (A R) es una enfermedad crónica en cuya etiopatogenia parece existir un trastorno inmunológico en la iniciación y perpetuación de los eventos característicos de la misma. Aunque en la A R pueden aparecer diferentes tipos de autoanticuerpos, los anticuerpos (Ac) anti-inmunoglobulinas (Ig), denominados factores reumatoides (F R), son los mas característicos de la enfermedad.

El F R Ig M es el mejor conocido, por su capacidad de aglutinar hematíes o partículas recubiertas con Ig G. También han sido descritos F R entre las Ig G, Ig A e Ig E.

Las primeras pruebas para la determinación del F R Ig M fueron descritas por Waaler y Rose^(1,2). Al igual que el test de látex^(3,4) están basadas en la aglutinación de hematíes o partículas recubiertas con Ig G. Estas técnicas presentan ciertos inconvenientes, como las variaciones de los títulos interobservador. Con la técnica de inmunofluorescencia y, posteriormente mediante Radio-inmuno-ensayo (RIE) y Enzima-inmuno-análisis (ELISA), ha sido posible cuantificar las distintas clases de F R.

El método de ELISA ha mostrado ciertas ventajas con respecto al RIE^(5,6), por ser simple y rápido y evitar el manejo de radiactividad.

El F R Ig M es un hallazgo común en el suero de los pacientes con A R, apareciendo en un 60%-80% de los casos. En otras patologías crónicas, colagenosis, enfermedades infecciosas y estados hiperglobulinémicos, se puede encontrar a título bajo.

La especificidad del F R para la A R se incrementa con la presencia de títulos elevados, reactividad tanto con

Ig G humana como con Ig G de conejo, y distribución entre las clases Ig M, Ig G e Ig A.

Los F R Ig G e Ig A están presentes en un buen número de pacientes con A R, siendo poco conocido su papel en la etiopatogenia y manifestaciones clínicas. El F R Ig G se ha asociado con la vasculitis reumatoide (135-137).

Clasicamente se ha atribuido un papel importante al F R Ig M en el diagnóstico y pronóstico de la A R. En varias comunicaciones recientes (144, 145, 146) se resalta también el valor pronóstico del F R Ig A.

De capital importancia en el manejo clínico de la A R ha sido la búsqueda de parámetros objetivos que reflejen las fluctuaciones en la actividad clínica y puedan tener valor pronóstico. Dado que existen datos heterogéneos acerca de la utilidad de las diferentes clases de F R en la evaluación clínica de los pacientes con A R, nos propusimos estudiar la prevalencia, implicaciones clínicas y valor pronóstico de los F R Ig M, Ig G e Ig A.

En este trabajo fueron incluidos 122 pacientes con A R, determinando los F R por la técnica de Waaler-Rose y por enzima-inmuno-análisis (ELISA).

Los resultados de nuestro estudio mostraron que un 61% de los pacientes tuvieron F R Ig M positivo por el test de Waaler-Rose, mientras que mediante ELISA fue del 85%. Confirmamos por tanto la sensibilidad del ELISA, como han referido varios autores (41, 41, 43). Esta sensibilidad fue similar con la utilización tanto del sustrato Ig G humana como de Ig G de conejo.

La prevalencia de los F R Ig G e Ig A fue del 52% y 67% respectivamente. Las concentraciones de F R Ig A se correlacionaron de forma significativa con las de F R Ig M,

estando a su vez directamente relacionadas con el índice de actividad de la A R.

En los varones hemos observado unos niveles séricos más elevados de las tres clases, de F R, al comparados con los de las mujeres.

De nuestro estudio concluimos que el método de ELISA es, por su sensibilidad, la técnica de elección para cuantificar las diferentes clases de F R. La sensibilidad y especificidad se incrementan cuando se utilizan para un mismo suero los substratos Ig G humana e Ig G de conejo; en este caso el número de pacientes seropositivos se elevó al 94%.

Los pacientes con A R que desarrollaron manifestaciones extraarticulares y progresión de las lesiones radiológicas presentaron concentraciones elevadas de los F R Ig M e Ig A, pero no del F R Ig G.

Desde el punto de vista pronóstico, encontramos empeoramiento clínico y desarrollo progresivo de erosiones en los pacientes con mayores niveles de los F R Ig M e Ig A.

Por último, las concentraciones de los tres F R estudiados tienden a sufrir sólo pequeñas variaciones en el curso de la A R, en especial el F R Ig A.

La determinación de otros F R diferentes del F R Ig M puede desempeñar un papel importante en el contexto clínico de la A R, sobre todo a la hora de decidir la instauración de un tratamiento "de fondo".

B I B L I O G R A F I A

- 1) Paget, S.A., Gibofsky, A. ; Immunopathogenesis of R A. Am J Med 67:961-970. 1979.
- 2) A Committee of the A.R.A.; Revision of diagnostic criteria of R A. Arthritis Rheum 2:16-20. 1958.
- 3) Waaler, E.: A factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. Third International Congress for Microbiology, New York, Abstracts of communications. pp 351. 1939.
- 4) Meyer, K.: Über Hämmagglutininvermehrung und Hämmagglutinations forderunde wirkung bei menschlichen sern. Z Immun 34:229-234. 1922.
- 5) Waaler, E: On the ocurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. Acta Pathol Microbiol Scand 17:172-178. 1940.
- 6) Rose, H.M., Ragan, C., Pearce, E. and Lipman, M.O.: Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with R A. Proceedings of the Soc for Exp Biol and Med 68:1-6. 1948.
- 7) Cecil, R.L., Nicholls, E.E. and Stainsby, W.J.: Characteristics of streptococci isolated from patients with Rheumatoid Fever and chronic infectious arthritis. Am J Pathol 6:619. 1939.
- 8) Dawson, M.H., Olmstead, M. and Boots, R.: Agglutination and precipitation reactions in R A sera and some other sera. Biologie Medicale 34:80-82. 1936.

9) Wallis,A.D.: R A II. Non specific serologic reactions
Am J Med Sci 212:713-722. 1946.

10) Bokisch,V.A., Chiao,J.V., Bernstein,D. and Krause,
R.M.: Homogeneous rabbit 7S anti Ig G with antibody specific-
ity for peptidoglycan. J Exp Med 138:1184-1193. 1973.

11) Heller,G., Jacobson,A.S. and Kolodny,M.H.: A modifi-
cation of the hemagglutination test for R A. Proc Soc Exp
Biol Med 72:316-323. 1949.

12) Singer,J.M., Plotz,C.M.: The latex fixation test .I.
Application to the serological diagnosis of R A. Am J Med
21:888-892. 1956.

13) Singer,J.M., Plotz,C.M.: The latex fixation test.
Application to the serological criteria for RA. Bull Rheum
Dis 9:175-176. 1958.

14) Singer,J.M.: Standarization of the latex test for
R A serology. Bull Rheum Dis 27:762-769. 1973.

15) Franklin,E.C., Holman,H.R., Muller-Eberhard,H.J. and
Kunkel,H.G.: Differential agglutination of normal and sensi-
tized sheep erythrocytes by sera of patients with R A. J Exp
Med 105:425-438.1957.

16) Kunkel,H.G., Muller-Eberhard,H.J., Fundenberg,H.H.:
Gammaglobulin complexes in R A and certain other conditions.
J Clin Invest 40:117. 1961.

17) Schroehenloher,R.D.: Gammaglobulin complexes in R A.
J Cin Invest 45:501. 1966.

18) Winchester,R.J., Agnello,V., Kunkel,H.G.: Gammaglobulin complexes in synovial fluids of patients with R A. Clin Exp Immunol 6:689-706. 1970.

19) Winchester,R.J., Kunkel,H.G., Agnello,V.: Occurrence of gammaglobulin complexes in serum and joint fluid of R A patients: Use of monoclonal R Fs as reagents for their demonstration. J Exp Med 134:286-295. 1971.

20) Heimer,R., Levin,F.M.: On the distribution of R F among de immunoglobulins. Immunochemistry 3:1. 1966.

21) Stobo,J.D., Tomasi,T.B.: A low molecular weight immunoglobulin antigenically related to 19S Ig M. J Clin Invest 46:1329-1337. 1967.

22) Bush,S.T., Swedlund,H.A., Gleich,G.T.: Low molecular weight Ig M in human sera. J Lab Clin Med 73:194-201. 1969.

23) Sage,D.E., Mannik,M.: 7S M-globulin in R A. Evaluation of its clinical significance. Arthritis Rheum 14:440-450 1971.

24) Coughlan,R.J., Gordon,Y, Clark,B., Panayi,G.S.: 7S Ig M in the sera of patients with arthritis. Br J Rheumatol 26:108-112. 1987.

25) Williams,R.C.Jr.: Adult and juvenile R A. In Clinical Immunopathology (Ed) Parker.C.W. Volume 1,pp. 699-752. Philadelphia: W. B. Saunders. 1980.

26) Hannestad,K., Johannessen,A.: Polyclonal human antibodies to Ig G (R F) with cross-react with cell nuclei. Scand J Immunol 5:541-547. 1976.

27) Johnson,P.M., Faulk,W.P.: R F: its nature, specificity and production in R A. Clin Immunol Immunopathol 6:414-430. 1976.

28) Robbins,D.L., Moore,T.L., Carson,D.A., Vaughan,J.H.: Relative reactivities of R F in serum and cells. Arthritis Rheum 21:820-826. 1978.

29) Tanimoto,K., Cooper,N.R., Johnson,J.S.,Vaughan,J.H.: Complement fixation by R F. J Clin Invest 55:437-445. 1975.

30) Taylor-Upsahl,M.M., Johnson P.M., Mellbye,O., Natvig J.B.: A study of complement fixation by R F using a haemolytic assay sistem. Clin Exp Immunol 28:204-211. 1977.

31) Kaplan,R.A., Curd,J.G., Deheer,D.H., Carson,D.A. et al: Metabolism of C4 and factor B in R A. Arthritis Rheum 23-911-920. 1980.

32) Nardella,F.A., Teller,D.C., Mannik,M.: Studies on the antigenic determinants in the self association of R F. J Exp Med 154:112-125. 1981.

33) Carson,D.A., Lawrance,S., Slaughter,L.,Vaughan,J.H.: Immunochemical properties of anti-Ig G antibodies. In Immunopathogenesis of R A (Ed). Panayi,G.S. and Johnson,P.M. pp.51-55. Surrey: Reedbooks. 1979.

34) Carson,D.A.: Rheumatoid Factor. In textbook of Rheumatology (Ed) Kelley W.N., Harris,E.D.Jr., Ruddy,S. and Sledge,C.B. pp.677-690. Philadelphia. W.B.Saunders. 1981.

35) Pope,R.M., Teller,D.C., Mannik,M.: The molecular basis of self association of antibodies to Ig G (R F) in R A.

Proc Nat Acad Scie. USA 71:517-521. 1974.

36) Munthe,E., Natvig,J.B.: Characterization of Ig G complexes in eluates from rheumatoid tissues. Clin Exp Immunol 2:249-262. 1971.

37) Hay,F.C., Niheman,L.J., Perumal,R., Roitt,I.M.: Intraarticular and circulating immune-complexes and antiglobulins (Ig G and Ig M) in R A : correlation with clinical features. Ann Rheum Dis 38:1-7. 1979.

38) Carson.D.A., Lawrance,S., Catalano,M.A.: R I A of Ig G and Ig M R F reacting with human Ig G. J Immunol 119: 295-300 . 1977.

39) Dunne,J.V., Carson,D.A., Spiegelberg,H.L., Alspauhg ,M.A., Vaughan J.H.: Ig A R F in the sera and saliva of patients with R A and Sjogren's Syndrome. Ann Rheum Dis 38:161-165. 1979.

40) Elkon,K.B., Delacroix,D.L.,Gharavi,A,E., Vaerman,J.P Hughes,G.R.V.: Immunoglobulin A and polymeric Ig A R F in Systemic Sicca Syndrome: partial characterization. J Immunol 129:576-581. 1982.

41) Koopman,W.J., Schoehenloher,R.E., Solomom,A.: A quantitative assay for Ig A R F. J Immunol Methods 50-89-98. 1982.

42) Zurow,B.L., O'Hair,C.H., Vaughan,J.H.: Immunoglobulin E-R F in the serum of patients with R A, Asthma and other diseases. J Clin Invest 68:1610-1613. 1981.

43) Permin,H., Egeskjold,E.M.: Ig E anti-Ig G antibodies in patients with juvenile and adult R A including Felty's Syndrome. Allergy 37:421-427. 1982.

44) Gioud-Paquet,M., Auvinet,M., Raffin,T., Girard,P., Bouvier,M.,Lejeune, E. Monier,C.: Ig M R F, Ig A R F, Ig G R F, and Ig E R F detected by ELISA in R A. Ann Rheum Dis 46:65-71. 1987.

45) Johnson,P.M.: Stimuli for anti Ig G antibody production in R A. In Immunopathogenesis of R A (Ed) Panayi,G.S. and Johnson,P.M. pp.40-50. Surrey:Reedbooks. 1979.

46) Allan,J.C., Kunkel,H.G.: Hidden R F with specificity for native gammaglobulins. Arthritis Rheum 9:758-768. 1966.

47) Natvig,J.B., Gaarder,P., Turner,M.W.: Ig G antigens of the CH2 and CH3 homology regions interacting with R F. Clin Exp Immunol 12:177-184. 1972.

48) Mannik,M.: R F. In Arthritis and Allied Conditions- (Ed) Mc Carty,D.J.,pp.504-512. Philadelphia: Lea and febiger. 1979.

49) Mc Cormick,J.N., Day,J.: The association of R F with antinuclear factor activity. Lancet, 14:554-556. 1963.

50) Agnello,V., Ibáñez de Kapes,G., Arbettea,A.E.,Spitz, J.R.: Significance of R F crossreactive with NDA-protein- (DNP). Arthritis Rheum 21:540. 1978.

51) Egeland,T.,Munthe,E.: Rheumatoid Factors. Clin Rheum Dis 9:135-160. 1983.

52) Nardella, F.A., Teller, D.C., Mannik, M.: Histidine-involvement in the antigenic site for self-association of Ig G R F. Arthritis Rheum 25:60. 1982.

53) Mannik, M., Nardella, F.A.: Ig G R F and self-association of these antibodies. Clin Rheum Dis 11:551-572. 1985.

54) Ledford, K.K., Goni, F., Pizzolato, M., Franklyn, E.C.: Preferential association of KIIb light chains with monoclonal human Ig MK autoantibodies. J Immunol 131:1322-1325. 1983.

55) Goni, F., Chen, P.P., Pons-Estel, B., Carson, D.A.: Sequence similarities and cross-idiotypic specificity of L chains among human monoclonal Ig MK with anti-globulin activity. J Immunol 135:4073-4079. 1985.

56) Luthra, H.S., Mc Duffie, F.C., Hunder, G.G., Samy, E.A.: Immune-complexes in sera and synovial fluids of patients with R A. J Clin Invest 56:458-466. 1975.

57) Halla, J.T., Volanakis, J.E., Schrohenloher, R.E.: Immune complexes in R A sera and synovial fluids. A comparison of three methods. Arthritis Rheum 22:440-448. 1979.

58) Hoddard, D.H., Moore, M.E.: Common tests for R F: - poorly standardized but ubiquitous. Arthritis Rheum 31:432-435 1988.

59) Pritchard, M.H., Jobbins, K.: Nephelometry versus differential agglutination titre in the measurement of R F. J Clin Pathol 34:396-399 . 1981.

60) Knight, R.H., Pritchard, R.K.: Nephelometry compared with differential antibody titre in routine R F measurements.

Ann Rheum Dis 41:426-429. 1982.

61) Bampton, J.L.M., Cawston, T.E., Kyle, M.V., Hazleman, B.L.: Measurement of R F by an enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) and comparison with other methods. Ann Rheum Dis 44:13-19 .1985.

62) Weinblatt, M.E., Schur, P.H.: R F detection by nephelometry. Arthritis Rheum 23:777-779. 1980.

63) Lindstrom, F.D.: Hidden R F in active seronegative RA Scand J Rheumatol 2:133-135. 1973.

64) Moore, T., Dorner, R.W., Zuckner, J.: Hidden R F in sero-negative juvenile R A . Ann Rheum Dis 33:255-257. 1974.

65) Estes, D., Atra, E., Peltier, A.: An immunofluorescent method for the detection of antigammaglobulins antibodies. Arthritis Rheum 16:59-65. 1973.

66) Kallerup, H.E., Egeskjold, E.M., Graudal, H.: Ig G, Ig M and Ig A R F in healthy adults and rheumatoid patients determined by an indirect immunofluorescence method. Scand J Rheumatol 8:1-9. 1979.

67) Bach, J.F., Delbarre, F.: Nouvelle méthode de détection du F R au niveau cellulaire. Comptes Rendus Academie Des Sciences. Paris 267:134-136. 1968.

68) Torrigiani, G., Roitt, I.M.: Antiglobulin factors in the sera from patients with R A and normal subjects. Ann Rheum Dis 26:334-340. 1967.

69) Waller, M., Richard, A.J.: The frequency of 7S R F and 22S complexes in human serum with positive latex tests for

R F. J Rheumatol 3:337-345. 1976.

70) Nardella, F.A., Mannik, M.: Non Immunospecific protein-protein interactions of Ig G. Studies of the binding of Ig G to Ig G immunoabsorbents. J Immunol 120:739-744. 1978.

71) Hay, F.C., Niheman, L.J., Roitt, I.M.: Routine assay for detection of Ig G and Ig M antiglobulins in seronegative and seropositive R A. Br Med J iii 203-204. 1975.

72) Koopman, W.J., Schroehenloher, R.E.: A sensitive radio-immunoassay for quantitation of Ig M R F. Arthritis Rheum 23:302-308. 1980.

73) Wernick, R., Lospalluto, J.J., Fink, C.H.W., Ziff, M.: Serum Ig G and Ig M R F by solid phase radioimmunoassay. Arthritis Rheum 24:1501-1511. 1981.

74) Quin, J.W., Giannikos, J., Robertson, P., Hand, S.J.: A simple radioactive binding assay for the detection of R F in serum. J Immunol Methods 34:217-224. 1980.

75) Schroehenloher, R.E., Koopman, W.J., Moldoveanu, Z., Solomon, A.: Activity of R F of different molecular sizes: comparison of autologous monomeric and polymeric monoclonal Ig A R F. J Immunol 134:1469-1474. 1985.

76) Van Weemen, B.K., Schuurs, A.H.W.M.: Immunoassay using antigen enzyme conjugate. Febs Lett 15:232. 1971.

77) Engvall, E., Perlmann, P.: Enzyme-linked-immunosorbent assay. Quantitative assay of Ig G. Immunochemistry 8:871.-1971.

78) Maiolini, R., Ferrua, B., Quaranta, J.F.: A sandwich

method of enzyme immunoassay. II. Quantitation of R F. J Immunol Methods 20:25-34. 1978.

79) Willems, F.Th.C., Klassen de Kort, C.C.M.: Enzyme-immuno assay for R F. Lancet, May 6:994-995. 1978.

80) Gripenberg, M., Wafin, F., Isomaki, H., Linder, E.: A simple enzyme immunoassay for the demonstration of R F. J Immunol Methods 31:109-118. 1979.

81) Vejtorp, M., Hoier-Madsen, M., Halberg, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of Ig M R F. Scand J Rheumatol 8:65-70. 1979.

82) Faith, A., Pontesilli, D., Unger, A., Panayi, G.S., Johns P.: ELISA assays for Ig M and Ig G R F. J Immunol Methods 55:169-177. 1982.

83) Highton, J., Hessian, P.A., Small, B., Palmer, D.G.: Clinical advantages from measurement of Ig M R F by enzyme-immunoassay. Br J Rheumatol 25:20-25. 1986.

84) Karsh, J., Halbert, S.P., Klima, E., Steinberg, A.D.: Quantitative determination of R F by an enzyme-labeled-immuno assay. J Immunol Methods 32:115-126. 1980.

85) Stone, R., Coppock, J.S., Dawes, P.T., Bacon, P.A., Scott, D.L.: Clinical value of ELISA assays for Ig M and Ig G R F. J Clin Pathol 40:107-111. 1987.

86) Halbert, S.P., Karsh, J., Anken, M.: A quantitative enzyme immunoassay for Ig M R F using human Ig G as substrate Am J Clin Pathol 74:776-784. 1980.

87) Pope,R.M., Mc Duffy,S.J.: Ig G R F: analysis of various species of Ig G for detection by radioimmunoassay. J Lab Clin Med 97:842-853. 1981.

88) Mellors,R.C., Heimer,R., Corcos,J., Korngold,L.: Cellular origin of R F. J Exp Med 110:875-886. 1959.

89) Munthe,E., Natvig,J.B.: Complement-fixing intracellular complexes of Ig G R F in rheumatoid plasma cells. Scand J Immunol 1:217-229. 1972.

90) Fehr,K., Velvart,M., Rauber,M.: Production of agglutinators and R F in plasma cells of rheumatoid and non-rheumatoid synovial tissues. Arthritis Rheum 24:510-519. 1981.

91) Henry,C.: Hemolytic plaque assays. In Selected- Methods in Cellular Immunology (Ed) Mishell,B.B. and Shiigi,- S.M.,pp.69-123. San Francisco: W.H. Freeman. 1980.

92) Egeland,T., Lea,T., Saari,G.: Quantitation of cells secreting R F of Ig G, Ig A and Ig M class after elution from rheumatoid synovial tissue. Arthritis Rheum 25:1445-1450. 1982.

93) Vaughan,J.H., Chihara,T., Moore,T.L.: R F-producing cells detected by direct hemolytic plaque assay. J Clin Invest 58:933-941. 1976.

94) Ginsburg,W.W., Finkelman,F.D., Lipsky,P.E.: Circulating and mitogen-induced Ig-secreting cells in human peripheral blood: evaluation by a modified reserved hemolytic plaque assay. J Immunol 120:33-39. 1978.

95) Alarcon,G.S., Koopman,W.J., Schrohenloher,R.E.: - Differential patterns of in vitro Ig M R F synthesis in seronegative and seropositive R A. Arthritis Rheum 25:150-155. 1982.

96) Koopman,W.J., Schroehenloher,R.E.: In vitro synthesis of Ig M R F by lymphocytes from healthy adults. J-Immunol 125:934-939. 1980.

97) Jasin,H.E., Ziff,M.: In vitro synthesis of Ig and Ig M R F by blood mononuclear cells from patients with R A. Arthritis Rheum 23:697. 1980.

98) Tsoukas,C.D., Carson,D.A., Fong,S: Cellular requirements for pokeweed mitogen-induced autoantibody production in R A. J Immunol 125:1125-1129. 1980.

99) Lothead,J.A., Smiley,J.D., Ziff,M.: Prolonged Ig synthesis by rheumatoid synovium in culture: quantitation of R F production. Arthritis Rheum 14:171-172. 1971.

100) Smiley,J.D., Sachs,C. Ziff,M.: In vitro synthesis of Ig by rheumatoid synovial membrane. J Clin Invest 47:624-632. 1968.

101) Koopman,W.J., Schroehenloher,R.E., Crago,S.S., Spalding,D.M., Mestecky,J.: Ig A R F synthesis by dissociated synovial cells. Arthritis Rheum 28:1219-1227. 1985.

102) Wernick,R.M., Lipsky,R.E., Marban-Arcos,E., Maliakcal,J.J., Edelbaum,D., Ziff,M.: Ig G and Ig M R F synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Arthritis Rheum 28:742-752. 1985.

103) Cecere, F., Lessard, J., Mc Duffy, S., Pope, R.M.: Evidence for the local production and utilization of immunereactants in R A. *Arthritis Rheum* 25:1307-1315. 1982.

104) Petersen, J., Heilman, C., Bjerrum, O.J. et al: Ig G R F-secreting lymphocytes in R A: evaluation of a haemolytic plaque-forming cell tehniqe. *Scand J Immunol* 17:471-478. 1983.

105) Patel, V., Panayi, G.S., Unger, A.: Spontaneous and pokeweed mitogen induced in vitro Ig and Ig M R F producing by peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells in R A. *J Rheumatol* 10:364-372. 1983.

106) Spalding, D.M., Haber, P., Schroehenloher, R.E., Koopman, W.J.: Production of Ig and R F by lymphoid cells in rheumatoid pericardium. *Arthritis Rheum* 28:1071-1074. 1985.

107) Halla, J.T., Koopman, W.J., Schroehenloher, R.E., Darby, W.L., Heck, L.V.: Local synthesis of Ig M and Ig M R F in rheumatoid pleuritis. *J Rheumatol* 10:204-209. 1983.

108) Elkon, K.B., Gharavi, A.E., Patel, B.M., Hughes, G.R.V., Frankel, A.: Ig A and Ig M R F in serum, saliva and other secretions; relationship to Ig ratios in Systemic Sicca Syndrome and R A. *Clin Exp Immunol* 52:75-84. 1983.

109) Hay, F.C., Niheman, L.J., Torrigiani, G., Roitt, I.M.: "Hidden" Ig G antiglobulins in normal human serum. *Clin Exp Immunol* 25:185-190. 1976.

110) Slaughter, R.L., Carson, D.A., Jensen, F.C.: In vitro effects of Epstein-Barr virus on peripheral blood mononuclear cells from patients with R A and normal subjects. *J Exp Med*

148:1429-1434. 1978.

111) Levinson,A.I., Dalal,N.F., Haidar,M., Tar,L., Orlow M.: Prominent Ig M R F production by human and blood lymphocytes stimulated in vitro with staphylococcus aureus cowan I. J Immunol 139:2237-2241. 1987.

112) Roitt,I.M., Corbett,M., Festenstein,,H.: HLA - DR4 and prognosis in R A. Lancet,May 6:990. 1978.

113) Statsny,P.: Association of the B-cell alloantigen DRw4 with R A. N Engl J Med 298:869-871. 1978.

114) Dobloug,J.H., Forre,O., Kass,E., Thorsby,E.: HLA antigens and R A. Arthritis Rheum 23:309-313. 1980.

115) Birdsall,H.H., Rossen,R.D.: Production of antibodies specific for Fc, Fab', and streptokinase-streptodornase in vitro by peripheral blood cells from patients with R A and normal donors. J Clin Invest 69:75-84. 1982.

116) Munthe,E., Natvig,J.B.: Ig classes, subclasses and complexes of Ig G R F in rheumatoid plasma cells. Clin Exp Immunol 12:55-70. 1972.

117) Gough,W.W., Davis,J.S.: Effects of R F on complement levels in vivo. Arthritis Rheum 9:555-565. 1966.

118) Schmid,F.R., Roitt,I.M.: Inhibition of complement action by R F. J Lab Clin Med 66:1019. 1965.

119) Hallberg,T.: In vitro cytotoxicity of human lymphocytes for sensitized chicken erythrocytes is inhibited by sera from R A patients. Scand J Immunol 1:329-338. 1972.

120) Baum, J., Statsny, P., Ziff, M.: Effects of the R F and antigen-antibody complexes on the vessels of the rat mesentery. *J Immunol* 93:985-992. 1964.

121) DeHoratius, R.J., Abruzzo, J.L., Williams, R.C.: R F activation of pulmonary lesions associated with experimental diffuse proliferative lung disease. *Arthritis Rheum* 15:293-301. 1972.

122) Gale, R.J., Nikoloutsopoulos, A., Bradley, J., Roberts Thomson, P.J.: Immune complex activation of neutrophils and enhancement of the activation by R F and complement. *J Rheumatol*. 12:21-26. 1984.

123) Blackburn, W.D. Jr., Koopman, W.J., Schroehenloher, R.-E., Heck, L.W.: Induction of neutrophil enzyme release by R F: evidence for differences based on molecular characteristics. *Clin Immunol Immunopathol* 40:347-355. 1986.

124) Nemazee, D.A., Sato, V.L.: Enhancing antibody: a novel component of the immune response. *Proc Natl Acad Scie USA*. 79:3828-3832. 1982.

125) Tesar, J.T., Schmidt, F.R.: Heterogeneity among R F for complement fixation. *J Immunol* 110:993-1002. 1973.

126) Van Snick, J., Van Roost, E., Marcowitz, B., Cambiaso-C.L.: Enhancement of Ig M R F of in vitro ingestion by macrophages and in vivo clearance of aggregated Ig G or antigen-antibody complexes. *Eur J Immunol* 8:279-285. 1978.

127) Helin, H., Korpela, M., Mustonen, J., Pasternack, A. : R F in R A associated renal disease and in lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 45:508-511. 1986.

128) Monestier, M., Bellon, B.A., Manheimer, J., Bona, C.A.: R F: Immunochemical, molecular and regulatory properties. Ann N Y Acad Scie 475:106-113. 1986.

129) Sinclair, N.R., Panaskaltis, H.: Immunoregulation by Fc signals. Immunol Today 8:77-79. 1987.

130) Brown, P.B., Nardella, F.A., Mannik, M.: Human complement activation by self-associated Ig G R F. Arthritis Rheum 25:1101-1107. 1982, .

131) Allen, C., Elson, C.J., Scott, D.G.I.: Ig G antiglobulins in R A and other arthritides; relationship with clinical features and other parameters. Ann Rheum Dis. 40:127-131. 1981.

132) Jonsson, T., Arnason, J.A., Valdimarsson, H.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) screening test for detection of R F. Rheumatol Int 6:199-204. 1986.

133) Shakib, F., Stanworth, D.R.: Antigammaglobulin (R F) activity of human Ig G subclasses. Ann Rheum Dis 37:12-17. 1978.

134) Carson, D.A., Lawrance, S.: Light chain heterogeneity of 19S and 7S anti-gammaglobulins in R A and subacute bacterial endocarditis. Arthritis Rheum 21:438-440. 1978.

135) Elkon, K.B., Caeiro, F., Gharavi, A.E., Patel, B.M., Ferjencik, P.P., Hughes, G.R.V.: Radioimmunoassay profile of antiglobulins in connective tissue diseases: elevated levels of Ig A R F. Clin Exp Immunol 46:547-556. 1981.

136) Quismorio, F.P., Beardmore, T., Kaufman, R.L., Mongan, E.S.: Ig G R F and antinuclear antibodies in rheumatoid vasculitis. Clin Exp Immunol 52:333-340. 1983.

137) Scott, D.G.I., Bacon, P.A., Tribe, C.R.: Systemic - rheumatoid vasculitis: a clinical and laboratory study of 50 cases. Medicine (Baltimore) 50:288-297. 1981.

138) Smiley, J.D., Hoffman, W.L.: Protein synthesis in rheumatoid synovial tissue. Springer seminars in Immunopathology 4:103-123. 1981.

139) Pope, R.M., Mc Duffy, S.J.: Ig G R F. Relationship to seropositive R A and absence in seronegative disorders. Arthritis Rheum 22:988-998. 1979.

140) Allen, C., Elson, C.I., Scott, D.G.I., Bacon, P.A.: IgG antiglobulins in R A and other arthritides. Ann Rh Dis 39:191. 1980.

141) Robbins, D.L., Feigal, D.W., Leek, J.C.: Relationship of serum Ig G R F to Ig M R F and disease activity in R A . J Rheumatol 13:259-262. 1986.

142) Withrington, R.H., Teitsson, I., Valdimarsson, H., Seifert, M.H.: Prospective study of early R A. II. Association of R F isotypes with fluctuations in disease activity. Ann Rheum Dis 43:679-685. 1984.

143) Schroehenloher, R.E., Koopman, W.J., Alarcon, G.S. : Molecular forms of Ig A R F in serum and synovial fluid of patients with R A . Arthritis Rheum 29:1194-1202. 1986.

144) Teitsson, I., Withrington, R.H., Seifert, M.H., Valdimarsson, H.: Prospective study of early R A: prognostic value of Ig A R F. *Ann Rheum Dis* 43:673-678. 1984.

145) Highton, J., Hessian, P.A., Small, B., Palmer, D.G.: - An assesment of the diagnostic value of quantitative measurements of Ig A R F. *J Rheumatol* 12:854-858. 1985.

146) Bienestock, J., Goldstein, G., Tomasi, T.B.: Urinary Ig A R F. *J Lab Clin Med* 73:389. 1969.

147) Elkon, K.B., Gharavi, A.E., Hughes, G.R.V., Moutsopoulos, H.M.: Autoantibodies in the Sicca Syndrome (primary Sjogren's Syndrome). *Ann Rheum Dis* 43:243-245. 1984.

148) Czerkinsky, C., Koopman, W.J., Jackson, S., Collins, J.E., Crago, S.S. et al: Circulating immune complexes and Ig A R F in patients with mesangial Ig A nephropathies. *J Clin Invest* 77:1931-1938. 1986.

149) Mizushima, Y., Shoji, Y., Hoshi, K., Kiyokawa, S.: - Detec-tion and clinical significance of Ig E R F. *J Rheumatol* 11:22-27. 1984.

150) Meretey, K., Falus, A., Erhardt, C.C., Maini, R.N.: IgE and IgE R F in circulating immune complexes in R A. *Ann Rheum Dis* 41:405-408. 1982.

151) Carson, D.A., Bayer, A.S., Eisenberg, R.A.: Ig G R F in subacute bacterial endocarditis. Relationship to Ig M R F and circulating immune complexes. *Clin Exp Immunol* 31:100-103 1978.

152) Lessard, J., Nunnery, E., Cecere, F., Mc Duffy, S., - Pope, R.M.: Relationship between the articular manifestations of R A and circulating immune complexes detected by three methods and specific classes of R F. *J Rheumatol* 10:411-417. 1983.

153) Wernick, R., Merryman, P., Jaffe, I., Ziff, M.: Ig G and Ig M R F in R A. Quantitative response to penicillamine therapy and relationship to disease activity. *Arthritis Rheum* 26:593-598. 1983.

154) Pope, R.M., Lessard, J., Nunnery, E.: Differential-effects of therapeutic regimens on specific classes of R F. *Ann Rheum Dis* 45:183-189. 1986.

155) Hanly, J.G., Hassan, J., Whelan, A., Feighery, C., Bresnihan, B.: Effects of gold therapy on the synthesis and quantity of serum and synovial fluid Ig M, Ig G and Ig A R F in R A patients. *Arthritis Rheum* 29:480-487. 1986.

156) Gordon, D.A., Stein, J.L., Broder, I.: The extraarticular features of R A. A systematic analysis of 127 cases. *Am J Med* 54:445-452. 1973.

157) Jacoby, R.K., Jayson, M.I.V., Cosh, J.A.: Onset, early stages and prognosis of R A: a clinical study of 100 patients with 11 years follow-up. *Br Med J* 2:96-100. 1973.

158) Duthie, J.J.R., Brown, P.E., Truelove, L.H., Baragar, - F.D., Lawrie, A.J.: Course and prognosis in R A. A further report. *Ann Rheum Dis* 23:193-202. 1964.

159) Feingenbaum, S.L., Masi, A.T., Kaplan, S.B.: Prognosis in R A. A longitudinal study of newly diagnosed younger adult

patients. Am J Med 66:377-384. 1979.

160) Sherrer, Y.S., Bloch, D.A., Mitchell, D.M., Young, D.Y., Fries, J.F.: The development of disability in R A. Arthritis Rheum 26:494-500. 1986.

161) Westedt, M.L., Daha, M.R., Baldwin III, W.M., Stijnen, T., Cats, A.: Serum immune complexes containing Ig A appear to predict erosive arthritis in a longitudinal study in R A. Ann Rheum Dis 45:809-815. 1986.

162) Ropes, M.W., Bennet, G.A., Cobb, S.: Diagnostic criteria for R A. Ann Rheum Dis 18:49-53. 1959.

163) Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A.: The American Rheumatism Association. 1987 revised criteria for the classification of R A. Arthritis Rheum 31:315-324. 1988.

164) Lansbury, J.: Report of a three-year study on the systemic and articular indexes in R A: theoretic and clinical considerations. Arthritis Rheum 1:505. 1958.

165) Steinbrocker, O., Traeger, C.H., Battermann, R.C.: Therapeutic criteria in R A. J A M A 140:659-662. 1949.

166) Milgrom, F., Tönder, O., Loza, V.: Modification of the Waaler-Rose test using formalinized sheep erythrocytes. Arthritis Rheum 7:1. 1964.

167) Stankaitiene, D.J., Matulis, A.A., Guobys, M., Juse-naite, J.: Serum antiimmunoglobulins reactive with human and rabbit Ig G in A R and other conditions. Arthritis Rheum 21:120-128. 1978.

168) Torrigiani,G., Roitt,I.M., Lloyd,K.N., Corbett,M.:
Elevated Ig G antiglobulins in patients with seronegative
R A. Lancet, Jan 3, 14-16. 1970.

169) Maury,C.P.J., Teppo,A.M.: R F and amyloidosis in
R A. Br Med J 291:1015-1016. 1985.

170) Ritchie,D.M., Boyle,J.A., McInnes,J.M.et al: Clini-
cal studies with an articular index for the assesment of
joint tenderness in patients with R A. Q J Med 37:393-406.
1968.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Antonio Narayo Hernández titulada Determinación de los factores reumatoides Ig M, Ig G e Ig A mediante ELISA en la Artritis Reumatoide = implicaciones clínicas y estudio prospectivo. acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente "Cum Laude"

Sevilla, 25 de Noviembre 1988

El Vocál,



El Presidente

El Vocál,



El Secretario,

El Vocál,



El Doctorado,

