

TÈCNiques ACTUALS EN EL DIAGNÒSTIC CLÍNIC DELS FENÒMENS D'AUTOIMMUNITAT

M.R. JULIÀ BENIQUE. N. MATAMOROS FLORI.

Secció Immunologia. Hospital Son Dureta. Ciutat de Mallorca.

1. Classificació de les malalties autoimmunitàries.

En general, les malalties autoimmunitàries es poden classificar en organospecífiques i no organospecífiques segons la reactivitat dels autoanticossos que les caracteritzen, restringides a un òrgan o a més d'un, respectivament; entre les dues categories existeixen trastorns amb anticossos d'especificitat intermèdia, no organospecífics però amb un nombre d'òrgans afectats molt limitat.

Les malalties organospecífiques presenten canvis crònics inflamatoris en un òrgan particular, principalment de funció endocrina, i els seus autoanticossos tenen freqüentment especificitat d'espècie i, si bé no sempre van acompanyats dels símptomes, s'associen entre ells i donen lloc al que s'anomena poliendocrinopatia autoimmunitària. Els autoantígens es localitzen de forma limitada a l'òrgan en qüestió i són "la diana" de l'atac immunitari; principalment es veuen afectats la tiroide, la glàndula adrenal, l'estómac i el pàncrees. Es poden establir, en general, models animals i es pot transferir la malaltia des dels animals afectats als sans mitjançant anticossos sèrics o limfòcits sensibilitzats.

Els processos no organospecífics presenten una àmplia varietat de canvis patològics a molt diferents òrgans i teixits i els autoanticossos no tenen especificitat d'espècie. Les lesions característiques d'aquestes malalties no són fàcilment reproduïbles de forma experimental, encara que espontàniament es produeixen a algunes línies animals. Els principals òrgans "diana" són els ronyons, la pell, les articulacions i el múscul. En aquests casos els antígens poden trobar-se acomplexats amb anticossos específics i formar immunocomplexos que es dipositen a diferents llocs i donen una variada simptomatologia. Com a les malalties organospecífiques, es troben sovint els mateixos anticossos a diferents síndromes encara que cadascuna d'elles presenti un perfil característic. Dintre d'aquests trastorns s'inclouen les connectivopaties d'origen autoimmunitari, que tractarem a continuació.

Finalment, malalties que combinen característiques dels dos tipus són, per exemple, les malalties hepàtiques autoimmunitàries.

2. Diagnòstic i seguiment de les connectivopaties.

L'estudi dels autoanticossos implicats en aquests trastorns ha permès purificar i identificar molècules intracel·lulars i caracteritzar llurs funcions, principalment les relacionades amb àcids nucleics (RNA i DNA) i viceversa; aquest coneixement pot ajudar a comprendre millor alguns fenòmens dels processos autoimmunitaris.

Amb les tècniques d'immunofluorescència s'han localitzat els principals autoantigens i s'ha vist que molt diferents orgànuls cel·lulars són dianes per als autoanticossos; les tècniques immunoquímiques, primerament la immunodifusió i després les modernes tècniques d'immunoprecipitació, com les que utilitzen antígens solubles marcats amb Met. S35 o P32 o les de Western-Blott, han demostrat que la majoria d'antígens són, a nivell molecular, complexos de RNA i proteïna. L'avanç en l'estudi dels autoanticossos ha revelat que les connectivopaties autoimmunitàries tenen un perfil definit d'anticossos, i el terme "anticossos antinuclears" (ANA) s'utilitza àmpliament com una denominació genèrica, encara que en ocasions les especificitats siguin nucleolars o citoplasmàtiques. Alguns ANA anomenats «anticossos marcadors» són específics d'un trastorn determinat, com l'anti-Sm al lupus, l'anti Scl-70 a l'esclerodèrmia difusa i l'anticentròmer a la síndrome CREST; altres es troben a diferents malalties però amb diferent prevalença, com per exemple l'anti-U1RNP al lupus i a la síndrome mixta del teixit connectiu (SMTc), on és molt més freqüent.

2.1. Tècniques de cribratge

Per al diagnòstic i seguiment d'aquests processos és convenient conjuntar diferents tècniques per aconseguir la màxima sensibilitat i especificitat possible. La investigació sol començar per un cribratge amb tècniques d'immunofluorescència o immunoenzímiques que incloguin com a substrats talls de teixits; els més utilitzats són el ronyó o el fetge de rata i de conill de rata, i empremtes fixades de cultius cel·lulars, com cèl·lules de la línia Hep-2, que ens permetran observar estructures pròpies de les cèl·lules en mitosi, com els centròmers. Alguns autoantigens es troben a molt baixa concentració en els teixits utilitzats habitualment, de forma que s'han d'utilitzar substrats especials, per exemple als anticossos anti-Ro, Scl70, PCNA, RANA i Ku. El problema de les tècniques d'immunofluorescència és el de la subjectivitat i la necessitat d'un microscopi especial; a més sempre serà necessari estandarditzar la tècnica a cada laboratori amb sèrums negatius i positius.

La fixació del teixit pot augmentar la sensibilitat per a la detecció dels ANA, però pot disminuir-la per a altres anticossos com els AMA. Els patrons observats als cribratges són indicatius d'alguns tipus d'ANA però no són diagnòstics d'una classe específica d'anticossos. A talls de teixit el patró homogeni és sovint produït per anticossos antidesoxiribonucleoproteïna i antihistones, el patró puntejat és típic dels anti-ENA i el patró nucleolar és indicatiu d'anticossos anti-RNA nucleolar. A empremtes de cultius cel·lulars els anti-DNA, histones i DNP tenyeixen la zona dels cromosomes de forma homogènia, i la resta de cèl·lules apareixen generalment amb tinció homogènia o anular; els anti-SSA, SSB, Sm i RNP tenyeixen només les cèl·lules no mitòtiques de forma puntejada; els anti-Scl70 presenten homogèniament positiva la zona dels cromosomes i les cèl·lules en repòs amb patró puntejat o nucleolar; finalment, els anti-centròmers presenten patró puntejat als cromosomes i a les cèl·lules en repòs.

La tècnica d'I.F. per als ANA és sensible però en ocasions poc específica, i dona alguns resultats positius a baix títol en gent sana d'edat avançada, en un 2-10 % de gent sana jove, i a diferents malalties sense tenir relació la seva patogènia amb l'autoimmunitat.

Altres tècniques utilitzades són les immunoenzímiques, que presenten l'avantatge de constituir preparacions permanents i no requereixen microscopi especial, però són difícils d'estandarditzar i la reproductibilitat és molt baixa entre els diferents lots de reactius. Darrerament s'han comercialitzat tècniques de cribratge per ELISA (Enzimimmunoassaig) que poden detectar anticossos antinucleosoma (DNA i histones) i anti-ENA i posteriorment les seves especificitats, però presenten el problema de la puresa dels antígens i per tant de l'especificitat.

Després de les tècniques de cribratge l'especificitat dels anticossos es determina per diferents mètodes, segons l'orientació diagnòstica i els resultats obtinguts al cribratge inicial. Així com per als anticossos anti-DNA hi ha hagut comercialització de tècniques des de fa anys, els anti-ENA (antígens nuclears extractables), principalment els quatre antígens més útils a la clínica; Sm, RNP, SSA i SSB, s'han determinat en general per tècniques elaborades als laboratoris. En general s'utilitzen extractes crus com el de tim de vedella, el de melsa i placentes humanes per als anti-SSA i el de tim de conill per als anti-RNP, Sm, SSB i Sc170. Amb aquests extractes es fan tècniques d'immunoprecipitació com la d'Ouchterlony (immunodifusió radial doble), que és senzilla i específica però poc sensible i sol ser necessari complementar-la amb la contraimmunoelctroforesi; potser la tècnica més desitjable seria la de Western-Blott en què l'extracte es separa en els distints polipèptids que el formen i es pot saber exactament amb quin d'ells reacciona el sèrum problema. Les tècniques d'ELISA presenten el problema de la necessitat d'antígens purificats, i el fet que alguns, com els SSB i RNP, s'estiguin clonant facilitarà una font barata i adequada d'antígens per a aquestes tècniques.

2.2. Autoanticossos al lupus sistèmic eritematós (LES).

El LES s'ha considerat com a prototipus de malaltia autoimmunitària per la varietat de manifestacions que indiquen una hiperactivitat o resposta immunitària aberrant. Podem destacar la presència de molt variats autoanticossos circulants (Taula I), hipergammaglobulinèmia, activació del complement, glomerulonefritis per immunocomplexos, vasculitis i anormalitats de les funcions dels limfòcits T i B.

TAULA I. Autoanticossos al lupus

AUTOANTÍGENS	PREVALENCIA DE L'ANTICÒS	CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS DE L'ANTÍGEN
DNAds	40%	DNA de doble cadena
DNAss	70%	DNA de cadena senzilla
Histones	70%	Histones classes H1, H2, H3, H4
Sm	30%	Proteïnes de 28, 29, 16 i 13 kd complexades amb RNAs U1, U2, U4, U5, U6
U1RNP	32%	Proteïnes de 33 i 22 kd complexades amb U1RNA nuclear.
SSA/Ro	35%	Proteïna de 60 Kd complexada amb Y1-Y5 RNAs
SSB/La	15%	Proteïna de 48kd complexada amb RNAs
Ku	10%	Proteïnes de 66 i 86 kd
RNP Ribosomal	10%	Proteïnes de 38, 16 i 15 kd
PCNA	3%	Proteïna 36 KD

El perfil serològic del LES es caracteritza per la presència simultània d'una mitjana de tres diferents autoanticossos per pacient; els anticossos més específics són els anti-DNA nadiu i l'anti-Sm amb rellevant importància en el diagnòstic diferencial de la malaltia. Respecte als anti-DNA es poden donar tres situacions, presència de:

- 1) Només anti-DNA de doble cadena (DNA ds).
- 2) Anti-DNA ds i anti-DNA desnaturalitzat o de cadena senzilla (DNA-ss).
- 3) Només anti-DNAss.

Les situacions 1 i 2 són característiques del LES, la 1 és molt poc freqüent, i la 3 no és específica, es pot donar en individus sans o amb una gran varietat de malalties reumàtiques. Aquests anticossos presenten important heterogeneïtat pel que fa a isotip d'immunoglobulina, fixació de complement i afinitat, i així els resultats varien molt segons la tècnica utilitzada. Hi ha tres tipus principals de tècniques: immunofluorescència amb *Critidia luciliae*, hemoflagel·lat que presenta un orgànul on s'acumula DNAdS; radioimmunoprecipitació amb DNA-I125 (tècnica de Farr); i enzimoinmunoassaig a fase sòlida. La primera i la tercera detecten anticossos de baixa i alta afinitat i el segon tipus només anticossos d'alta afinitat. S'ha vist que amb la que millor es relaciona l'activitat clínica és amb la d'immunofluorescència, però per al diagnòstic convé sempre combinar diverses tècniques perquè no n'hi ha cap d'alta sensibilitat. L'heterogeneïtat d'aquests anticossos pot explicar les reaccions encreuades detectades amb un altre tipus d'anticòs, l'anticardiolipina, antifosfolípid detectat a variades malalties reumàtiques que s'ha relacionat amb augmentada freqüència de trombosi i/o trombocitopènia i amb avortaments de repetició; fins i tot, s'ha suggerit l'existència d'un subgrup de LES caracteritzat per aquests anticossos, existència de livedo reticular (una afectació de la pell relacionada amb vasculitis) i afectació neurològica, però hi ha autors que dubten de la seva especificitat, i darrerament s'ha demostrat que aquestes reaccions encreuades, facilitades per la presència de grups fosfòrics a l'estructura del DNA, es donarien en els anticossos de baixa afinitat i rarament en els altres.

El DNA, juntament amb les histones, forma part del nucleosoma, un dels tres autoantígens més actius al LES. Els altres dos són complexos de RNA i proteïna, U1RNP i RoRNP, cadascun d'ells dona lloc als autoanticossos més freqüents al LES, que també es troben a altres malalties amb diferents característiques i prevalença. En primer lloc els antihistones es troben amb gran freqüència a la síndrome "lupus-like" induïda per procaïnamida, però a diferència del LES aquests pacients no tenen addicionalment anti-DNAdS ni anti-Sm, només anti-DNAss. Els malalts asimptomàtics es diferencien dels simptomàtics en el fet que en els primers els antihistones són predominantment de tipus IgM amb àmplia especificitat, mentre que als segons són generalment de tipus IgG i reaccionen principalment amb el dímer H2A-H2B (Taula II). L'U1RNP consisteix en 9 polipèptids i U1RNA; part d'aquests polipèptids són reconeguts pels anti-RNP i part pels anti-Sm. L'associació física d'aquests antigens és la responsable de la freqüent coincidència d'ambdós anticossos en el mateix pacient: hi apareixen primer els anti-RNP i tan sols en alguns casos, posteriorment, s'acompanyen dels anti-Sm. Aquests darrers s'han relacionat amb una forma moderada de lupus degut possiblement a la seva interacció amb complexos DNA/antiDNA. El tercer autoantigen important és el RoRNA, que és format de 1 a 5 petits RNA, *human cytoplasmic* 1-5 RNA (h Y1-5RNA), acomplexats amb polipèptid Ro i polipèptid La; aquesta estructura explicaria també la coexistència en alguns casos d'anti-Ro i anti-La en alguns malalts amb lupus. Els primers, més freqüents, poden presentar-se de forma aïllada; els segons pràcticament sempre s'acompanyen dels primers. La presència simultània de Ro i La s'ha associat amb baixa freqüència de nefritis, mentre que si només es presenta anti-Ro, aquesta freqüència augmenta i coincideix amb alta incidència d'anti-DNA

Lupus ANA-negatiu5

Aproximadament un 5% dels pacients amb LES no tenen ANA detectables per cribratge sobre tall de teixit. Aquest subgrup presenta característiques clíniques pròpies: fotosensibilitat, rash cutani difús, poliartritis i poca afectació sistèmica; no gensmenys, sí que s'han trobat anticossos no detectables per aquesta tècnica; el més freqüent és l'anti-SSA/Ro.

S'ha associat aquest subgrup de lupus a dèficit del factor C2 del complement, concomitant amb la presència d'anti-Ro, també al lupus cutani subagut, i a mares de nens afectats per lupus neonatal s'ha trobat l'anti-RO associat amb el fenotip HLADR3.

2.3. Síndrome mixta del teixit connectiu (SMTc).

Aquesta malaltia presenta símptomes de LES, esclerodèrmia i polimiositis, i a nivell serològic es caracteritza per la presència a alt títol d'anticossos anti-RNP sense anti-Sm. Una petita proporció de malalts tenen anti-DNAs o anti-DNAss.(taula II).

2.4. Síndrome de Sjögren.

El seu perfil d'ANA inclou anti-SSA/Ro i anti-SSB/La amb una prevalença superior que al lupus. (taula II).

TAULA II. Autoanticossos al lupus induït per drogues, SMTc, S. Sjogren

Síndrome i autoantigen	Prevalença de l'anticòs	característiques moleculars de l'antigen
1) Lupus induït per drogues: DNAss Histones	80% >95%	DNA de cadena senzilla Histones: H1, H2, H3, H4, H2A-H2B a simptomàtics
2) SMTc: U1RNP	>95%	Proteïnes de 33 i 22 kd complexades amb RNA U1
3) S. Sjögren: SSA/Ro	60%	Proteïnes de 60 kd complexades amb Y1-Y5RNAs
SSB/Ro	40%	Proteïna de 48 Kd complexada amb RNAs

2.5. Dèrmato-miositis i Polimiositis.

Es caracteritzen per la presència d'anticossos anti-RNA-sintetasa. Els més importants són l'anti-Jo1, d'alta prevalença a la polimiositis, que s'ha trobat en un grup d'aquests malalts que tenen trastorn pulmonar intersticial associat, i l'anti-PM-Sc1, que es presenta en malalts amb símptomes de polimiositis i esclerodèrmia. En general en aquestes malalties els autoanticossos tenen poca prevalença i els autoantígens són predominantment citoplasmàtics.

2.6. Esclerodèrmia.

Els autoanticossos més rellevants són l'anti-Sc170 i l'anticentròmer; el primer reconeix una proteïna de 70 kd, producte de la degradació de la DNA-topoisomerasa I, i és anticòs marcador de l'esclerodèrmia difusa, a diferència de l'anticentròmer, selectiu de la síndrome CREST (calcinosi, Raynaud, dismotilitat esofàgica, esclerodactília i telangiectàsies), que reconeix proteïnes de 17, 80 i 140 kd unides a la cromatina centromèrica.

La coexistència d'anti-Sc170 i anticentròmer rarament s'ha trobat. A l'esclerodèrmia localitzada el patró d'ANA es diferencia clarament de la difusa per l'absència d'anticentròmer i anti-Scl-70; no gensmenys, als dos casos s'hi troben anticossos nucleolars i la tècnica de cribratge amb tall de teixit és molt poc sensible; per tant es recomana realitzar-la amb cèl·lules en cultiu.

3. Autoanticossos a les malalties hepàtiques

Als trastorns hepàtics els autoanticossos amb més prevalença són els ANA, anti-fibra lliça (SMA), antimitocondrials (AMA) i antimicrosòmic (LKM).

Els ANA es troben aproximadament al 75% d'hepatitis cròniques actives (HCA), al 46 % de cirrosis biliars primàries (CBP) i al 38 % de cirrosis criptogèniques (CC), i no tenen una importància vital en el diagnòstic diferencial d'aquestes malalties.

Els antimitocondrials (anticossos organospecífics) sí que tenen rellevància diagnòstica. Es troben al 90% de cirrosis biliars primàries a alt títol i a un 25-30 % d'hepatitis cròniques actives a més baix títol, però no es presenten a l'obstrucció extrahepàtica ni a l'hepatitis vírica i molt rarament a la població sana; són per tant un criteri diagnòstic important a la CBP. Hi ha resultats contradictoris pel que fa a la coincidència amb biòpsies positives en els casos d'absència de signes clínics i de laboratori característics de CBP, però quan aquests es presenten els AMA són una aportació important que pot fer innecessària la biòpsia. La titulació d'aquests anticossos no es correlaciona amb la severitat o duració dels símptomes i no sempre disminueix amb el tractament. Els patrons d'immunofluorescència es poden confondre amb els que donen els anticardiolipina, antiribosòmics i anti-LKM.

Es distingeixen sis tipus d'AMA, dels quals el M2 és el més freqüentment associat a la CBP, i darrerament se n'ha descrit un subtipus, el M2(1), que només tenyeix els túbuls distal i col·lector i també reacciona amb hepatòcits i cèl·lules parietals gàstriques de forma difusa i no és característic de CBP sinó que es presenta a altres trastorns hepàtics i a diferents malalties autoimmunitàries.

En general els AMA reaccionen amb fosfolípids o lipoproteïnes de la membrana mitocondrial, en algun cas associades a ATPasa (M2). Altres subtipus (M5 i M3) s'han relacionat més amb col·lagenosis que amb malalties hepàtiques.

Els LKM, també organospecífics, tenen una prevalença molt petita i sobretot es troben a l'hepatitis crònica activa. S'ha suggerit que podrien caracteritzar un subgrup de pacients amb baixa freqüència d'ANA i SMA, majoritàriament homes joves en començar la malaltia. Reaccionen amb proteïnes dels microsomes hepàtics i se n'han descrit dos subtipus: un típic de l'hepatitis per halotà i l'altre trobat a l'hepatitis per àcid tienílic.

Els SMA (histoespecífics) tenen com a antigen diana l'actina i poden ser útils per a diferenciar el LES (ANA+SMA-) de l'hepatitis lupoide (ANA+SMA+).

4. Diagnòstic i seguiment dels trastorns associats a autoanticossos organospecífics.

Exceptuant la glàndula pineal s'han trobat autoanticossos dirigits contra totes les glàndules endocrines i en general es correlacionen bé amb els símptomes clínics, la histologia i l'empitjorament de la secreció hormonal. Aquests autoanticossos poden actuar conjuntament amb limfòcits en un procés destructiu, poden reaccionar amb receptors hormonals i donar lloc a l'estímul de la secreció hormonal i al creixement de l'òrgan o bé bloquejar aquests receptors i produir una disminució de la secreció i gradual atròfia de l'òrgan afectat. A la taula 3 s'esquematitzen els principals anticossos trobats, les tècniques de detecció més importants i la prevalença a la població sana i afectada. No s'hi inclouen els AMA i LKM, ja descrits.

TAULA 3 Autoanticossos a les malalties organospecífiques.

Malaltia	Localització Antigen-Tècnica	Prevalença als Individus sans	Prevalença als malalts
1. PROCESSOS DESTRUCTIUS			
Tiroiditis de Hashimoto	Microsomes tiroides (HA/ELISA)	60-90%	0-20%*
Mixedema primari	Tiroglobulina (HA/ELISA)	50-70%	0-20%*
Gastritis fúndica (A)	Cèl. Parietal gàstrica (IF)	60% ^d 20% ^h	0-16%*
Gastritis antral (B)	Cèl secretores gastrina (IF)	10-20%	0,1%
Addison	Còrtex adrenal (IF, RIA, ELISA)	60-88%	0,1%
Ins. gonadal	Esperma i òvul	—	7%(esp.)
Hipoparatiroidisme ^{1ari}	Cèls. ppals. paratiroides	rarament	—
Diabetis insípida ^{1aria}	Cèls. hipotalàmiques	30-60%	0.01%
Diabetis mellitus I	Cèls. illots pancreàtics (IF)	70-80%(i)	0.5%
Vitiligen	Melanòcit (IF, RIA)	90%	—
Diarrea persistent infantil	Enteròcit	—	—
Anèmia perniciosa	Cèl. parietal gàstrica (IF)	80-90%	0-16%*
	Factor Intrínsec (RIA)	56%	0.1%
2. ANTICOSSOS BLOCADORS			
Miastènia greu pseudoparalítica	Receptors ac. colina	60-90%	1%
Deficiència gonadal	Receptors gonadotropina	—	—
Tiroiditis atròfica AI	Receptors TSH	—	—
Addison	Receptors ACTH	—	—
Gastritis fúndica atròfica			
Anèmia perniciosa	Receptors gastrina	—	—
Asma bronquial	Receptors ßadrenèrgics	—	—
3.-ANTICOSSOS ESTIMULANTS			
Tirototoxicosi de Graves	Receptors TSH	50-90%	—
Síndrome de Cushing	Receptors ACTH	—	—
Úlcera duodenal	Receptors histamina H ₂	—	—

* dependent de l'edat i el sexe, h: homes, d: dones, i: a l'inici dels símptomes

Les tècniques més habituals són les d'immunofluorescència sobre talls de teixit, preferentment de donant humà de grup 0, obtinguts d'operacions o de cadàvers poc després de la mort; els teixits animals, sobretot de primat poden ser adequats però de vegades donen falsos positius. Aquestes tècniques s'han perfeccionat, per exemple, amb l'ús d'avidina/biotina o amb doble marcatge amb rodamina/fluoresceïna, que permet diferenciar els autoantígens i les hormones en un determinat teixit (s'utilitza sèrum del pacient i anticossos monoclonals animals antihormona). Altres tècniques més sensibles són les d'hemoaglutinació passiva (HA), radioimmunoassaig (RIA) i enzimmunoassaig (ELISA). Aquests mètodes són quantitius i més adequats per a nombres elevats de mostres, però no indiquen la situació de l'antigen i els autoantígens solubles es poden perdre o alterar amb la unió a la fase sòlida. Les tècniques d'hemoaglutinació s'han utilitzat sobretot per als antígens tiroglobulina i microsòmic, però aquesta tècnica s'està substituint per l'ELISA a la rutina, ja que és més sensible.

La contribució al diagnòstic d'aquestes tècniques no és actualment de vital importància, exceptuant el cas dels antimicrosòmics i els antitiroglobulina a les malalties de la tiroide, en què la determinació conjunta d'ambdós anticossos permet la detecció del 97% de tiroïdits cròniques, encara que també són característics del mixedema primari i la malaltia de Graves. Per a altres malalties pot ser interessant realitzar determinacions de cribratge a grups concrets d'individus. Així, segons Doniach i Botazzo, serien interessants per a:

- 1) Pacients amb autoimmunitat en un òrgan endocrí i els seus parents de primer grau (principalment important a la diabetis tipus I, per l'aparició, prèvia als símptomes, dels antiïlots pancreàtics i els antiinsulina)
- 2) Pacients amb trastorns no endocrins associats a autoimmunitat endocrina, per exemple al·lèrgies, immunodeficiències, etc., i els seus parents de primer grau.
- 3) Dones de mitjana edat amb símptomes de fatiga i depressió.
- 4) Pacients amb trastorns d'etiologia desconeguda.
- 5) Dones amb infertilitat i amenorrea, que poden tenir anticossos anti-cèl·lules productores de prolactina o anti-cèl·lules adrenals i gonadals.

Bibliografia

1. BOTAZZO G.F. et al. "Organ Specific Autoimmunity: A 1986 Overview". Immunol. Rev. 94:137-162.1986.
2. TAN E.M. et al. "Short analytical Review". Antinuclear antibodies (ANA): Diagnostically Specific Immune markers and Clues Toward The understanding of Systemic Autoimmunity". Clin. Immunol. Immunopathol. 47:121-141.1988.
3. McMILLAN SA. "Diversity of autoantibodies in patients with antimitochondrial antibody and their diagnostic value". J. Clin. Pathol. 1987, 40:232-236.
4. ISENBERG D., SHOENFELD Y. "The origin and significance of anti-DNA antibodies". Immunology Today, vol 8, n.9, 1987.
5. SARVAS H. "Anti-DNA antibodies: The choice of assays for routine diagnostic work". et al. Acta Path. Microbiol. Scand. SEct C,93:13-18.1985
6. TODD I. BOTAZZO G.F. "Laboratory Investigation of Autoimmune Endocrine Diseases" In "Clinics in Immunology and allergy". W.B. Saunders Company. London 1985.
7. NAKAMURA. PEEBLES. RUBIN. MOLDEN. TAN. "Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA). Advances in Laboratory tests and Significance in Systemic Rheumatic Diseases". American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago 1985.