

11261

2  
EJ



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ANTICUERPOS ANTI-FOSFATIDILCOLINA  
COMO ANTICUERPOS NATURALES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(INMUNOLOGIA)**

**PRESENTA EL :**

**Q.F.B. JAVIER CABIEDES CONTRERAS**

**DIRECTOR DE TESIS :**

**DR. DONATO ALARCON SEGOVIA**

**MEXICO, D. F.**

**1993**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

1. RESUMEN	1
2. ABREVIATURAS	2
3. GENERALIDADES	
3.1 Antecedentes históricos	5
3.2 Anticuerpos anti-fosfolípidos	6
3.2.1 Anticuerpos anti-fosfolípidos como anticuerpos naturales	6
3.2.2 Factores inmunogenéticos y aFL	9
3.2.3 Des-regulación inmune y aFL	11
3.2.4 aFL como anticuerpos anti-idiotipo	11
3.2.5 aFL inducidos por fármacos	12
3.2.6 aFL inducidos por infecciones	13
3.3 Anticuerpos anti-fosfolípidos y anemia hemolítica	13
3.4 Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SAF)	15
3.5 Epítopes reconocido por los aFL	17
3.6 Heterogeneidad funcional e inmunológica de los aFL	19
4. HIPOTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
6. MATERIALES Y METODOS	
6.1 ELISA para detectar aFTC	24
6.2 ELISA para detectar anticuerpos contra DNA	24
6.3 ELISA para detectar factor reumatoide (FR)	25
6.4 Adsorción de los sueros con GRr	25
6.5 Eritrocitos de ratón tratados con bromelina	25
6.6 Inhibición de los aFL con micelas de FL	26
6.7 Ensayos de competencia	26
6.8 Ensayo hemolítico	27
6.9 Detección de anticuerpos anti-nucleares y anti-citoplásmicos por inmunofluorescencia indirecta	27
6.10 Determinación del epítipo reconocido por los aFL	28
6.11 Determinación de la reactividad cruzada de los aFTC contra vimentina e identificación por inmunopunto (Dot blot) del isotipo de inmunoglobulina absorbida por las micelas de FTC.	28
6.12 Electroinmunotransferencia (Western blot) de vimentina	29

<b>7. RESULTADOS</b>	
7.1 Identificación de los aFTC por ELISA	31
7.2 Reconocimiento de EBr	31
7.3 Actividad anti-DNAcs	33
7.4 Actividad anti-DNAcd	36
7.5 Actividad de factor reumatoide	38
7.6 Ensayo hemolítico	41
7.7 Epítopes reconocidos por los aFTC	43
7.8 Detección de AAN y AAC por IFI	46
7.9 Determinación de la reactividad cruzada de los aFTC con vimentina	49
7.10 Electroinmunotransferencia (Western blot)	51
<b>8. DISCUSION</b>	<b>54</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>65</b>

## 1. RESUMEN

Todos los ratones normales y autoinmunes tienen autoanticuerpos naturales que reconocen eritrocitos bromelinizados (EBr). El epítoto principal que se expone con este tratamiento enzimático es la fosfatidilcolina (FTC), fosfolípido de carga neutra localizado en la cara externa de la membrana de las células. Estos anticuerpos que reconocen FTC son de isotipo IgM y los producen principalmente las células B Ly-1<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>), un subgrupo de células B a las que se les ha atribuido la función de producir autoanticuerpos naturales de clase IgM. También se ha visto que en el ratón los anticuerpos anti-fosfatidilcolina (aFTC) son codificados por cuando menos 5 genes V<sub>H</sub>. Recientemente describimos el caso de un paciente con anemia hemolítica autoinmune y títulos altos de anticuerpos anti-cardiolipina de clase IgM que tienen reactividad cruzada con FTC y que portan el idiotipo 16I6 codificado por genes de línea germinal. Encontramos además que dichos anticuerpos reconocen eritrocitos humanos y de ratón bromelinizados y envejecidos *in vitro*. Tomando en cuenta los antecedentes anteriores se plantearon los siguientes objetivos: 1. Determinar si hay aFTC en sueros de una población humana normal. 2) Determinar el isotipo de los aFTC. 3) Determinar si estos anticuerpos tienen reactividad cruzada con otros fosfolípidos u otras proteínas. 4) Identificar el epítoto que reconocen y 5) Determinar su capacidad hemolítica.

Estudiamos por ELISA (IgG e IgM) la presencia de aFTC en el suero de 100 individuos clínicamente sanos. Nuestros resultados muestran que el 85% de los sueros tienen aFTC de clase IgM a títulos bajos y ninguno tiene aFTC de clase IgG. Estudiamos además 13 de los 100 sueros en los siguientes ensayos: anticuerpos contra eritrocitos de ratón bromelinizados (ERBr) y eritrocitos humanos bromelinizados (EHBr), de isotipos IgG e IgM por citometría de flujo; factor reumatoide y anticuerpos anti-DNA por ELISA, e inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como sustrato células HEP-2. Los trece sueros tuvieron anticuerpos IgM contra ERBr y EHBr; de éstos, nueve se inhibieron con micelas de FTC. Todos los anticuerpos de clase IgM aFTC se inhibieron también con fosforilcolina y ácido fosfatídico. La reactividad de 8 de los sueros contra gama globulina agregada (GGA) fué inhibida con DNA y con micelas de FTC. Sels sueros IgM anti-DNA positivos se inhibieron con DNA soluble, así como con GGA y FTC. Todos los sueros tuvieron anticuerpos de clase IgM contra filamentos intermedios por IFI y todos reaccionaron contra vimentina purificada en el ensayo de inmunoelectrotransferencia.

Nuestro estudio muestra que la mayoría de los individuos sanos tienen aFTC de clase IgM a títulos bajos y que estos anticuerpos reconocen fosforilcolina como epítoto primario. Los anticuerpos aFTC detectados en sujetos sanos tienen capacidad hemolítica. El isotipo y la reactividad contra antígenos evolutivamente conservados son características de los autoanticuerpos naturales.

## 2. A B R E V I A T U R A S

ACo	Acetilcolina.
AF	Acido fosfatídico.
AL	Anticoagulante lúpico.
Ac	Anticuerpo.
aCL	Anticuerpos anti-cardiolipina.
AAC	Anticuerpos anti-citoplásmicos.
aFTC	Anticuerpos anti-fosfatidilcolina.
aFTE	Anticuerpos anti-fosfatidiletanolamina.
aFL	Anticuerpos anti-fosfolípidos.
AAN	Anticuerpos anti-nucleares.
Ag	Antígeno.
$\beta_2$ GP-I	$\beta_2$ Glicoproteína-I.
C <sup>3</sup>	Denota la participación de la cascada del complemento.
C4A	Locus A del cuarto componente de la cascada del complemento.
C4B	Locus B del cuarto componente de la cascada del complemento.
Cit	Citoplásmico.
CD4	Determinante de grupo número 4 (Closter Designation).
CD5	Determinante de grupo número 5 (su contraparte en el ratón Ly-1).
CL	Cardiolipina.
DE	Desviación estándar.
DNA	Acido desoxirribonucléico.
DNAcD	Acido desoxirribonucléico de cadena doble.
DNAcS	Acido desoxirribonucléico de cadena simple.
DO <sub>405</sub>	Densidad óptica leída a 405 nanometros (nm).
DO <sub>540</sub>	Densidad óptica leída a 540 nanometros.
Dex	$\alpha$ -1,3 dextrán.
EBr	Eritrocitos tratados con bromelina (bromelinizados).
EDTA	Acido etilendiamino tetracético.
EHBr	Eritrocitos hermanos bromelinizados.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme linked immunosorvent assay).
EMTC	Enfermedad mixta del tejido conectivo.
ERBr	Eritrocitos de ratón bromelinizados.
FI	Filamentos intermedios.
FITC	Isotiocianato de fluoresceina (Fluorescein Isothiocyanate)
FL	Fosfolípido.
FR	Factor reumatoide.
FriC	Fosforilcolina.
FTC	Fosfatidilcolina.
FTE	Fosfatidiletanolamina.
FTS	Fosfatidilserina.

g	Aceleración de la gravedad.
GGA	Gamaglobulina agregada.
GFR	Globulos rojos de ratón.
HEp-2	Línea celular de carcinoma de laringe humano (Human Epithelial-2).
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (Human leukocyte Antigens).
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana (Human Immunodeficiency Virus).
H <sub>2</sub> O <sub>DD</sub>	Agua destilada desionizada.
HEPES	(Acido N-[2-Hidroxiethyl]piperazina-N'-[etanosulfónico]).
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgM	Inmunoglobulina M.
INNSZ	Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.
LBD	Lipoproteínas de baja densidad.
LEG	Lupus eritematoso generalizado.
LisoFTE	LisoFosfatidiletanolamina.
M	Concentración molar.
MEM	Medio esencial mínimo (Medio de cultivo).
MG	Moteado grueso.
N	Concentración normal.
Neg	Negativo.
NZB	Cepa de ratones negros de Nueva Zelanda (New Zeland White).
NZW	Cepa de ratones blancos de Nueva Zelanda (New Zeland Black).
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate buffer saline).
PAGE-SDS	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Polyacrylamide Gel with Sodium dodecyl sulfate).
P/V	Concentración peso/volumen.
RIA	Radio inmunoanálisis.
RNP	Ribonucleoproteínas.
rpm	Revoluciones por minuto.
SAF	Síndrome de anti-fosfolípidos.
SAFP	Síndrome de anti-fosfolípidos primario.
SBF	Suero bovino fetal.
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate).
SHN	Suero humano normal.
Sm	Antígeno Smith.
TA	Temperatura ambiente (Aproximadamente 20 °C).
TEMED	(N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamino).
TM	Trombomodulina.
TMA	Trimetilamonio.
TPTA	Tiempo parcial de tromboplastina activa.
VDRL	Exámen de laboratorio usado para diagnosticar sífilis (Venereal Disease Reference Laboratory).

$V_H$   
 $V_L$   
 $V_L$   
 $V/V$

Región variable de las cadenas pesadas.  
Región variable de las cadenas ligeras kappa.  
Región variable de las cadenas ligeras.  
Concentración volumen/volumen.



### 3. GENERALIDADES

#### 3.1 Antecedentes históricos

La asociación entre manifestaciones clínicas y presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL) fué reportada primeramente en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG), quienes presentaban trombosis u otras manifestaciones vasculares periféricas, anticoagulantes circulantes y/o prueba serológica para sífilis falsa positiva (1). No obstante, fue hasta que se desarrollaron técnicas más sensibles y específicas para la detección de anticuerpos anti-cardiolipina (aCL), que se pudo conocer la verdadera magnitud de esta asociación. Con la aplicación del radioinmunoanálisis (RIA) (2) y posteriormente del ensayo inmunoenzimático (ELISA) (3), para la detección de los anticuerpos aCL, se hizo claro que en pacientes con LEG la presencia de anticuerpos aFL puede asociarse con diversas manifestaciones clínicas que constituyen un síndrome dentro de la enfermedad (4). Posteriormente se encontró que el síndrome puede presentarse en pacientes con títulos altos de aFL, y las manifestaciones clínicas a las que se asocian estos anticuerpos, en ausencia de datos clínicos o serológicos de otra enfermedad primaria, se le denominó "síndrome de anti-fosfolípidos primario" (SAFP) (5-7), para distinguirlo del síndrome de anti-fosfolípidos secundario o asociado que se presenta primordialmente en pacientes con LEG.

### **3.2 Anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL)**

Existen muchas circunstancias en las cuales los aFL pueden aparecer en un individuo, las más importantes son: 1.- como anticuerpos naturales, en cuyo caso son autoanticuerpos codificados por genes de línea germinal; 2.- como resultado de la interacción de factores inmunogenéticos y factores ambientales; 3.- como consecuencia de una desregulación inmune y/o activación policlonal intrínseca de una enfermedad autoinmune; 4.- como anticuerpos anti-idiotipo de otros anticuerpos; 5.- inducidos por fármacos, y 6.- como resultado de procesos infecciosos, en cuyo caso, la génesis de los anticuerpos aFL es principalmente dirigida por antígeno.

#### **3.2.1 Anticuerpos anti-fosfolípidos como anticuerpos naturales**

Todos los ratones normales tienen anticuerpos naturales de clase IgM contra ERBr (24, 25). El epítipo que se expone con el tratamiento de estas células con bromelina, es la fosfatidilcolina (FTC), fosfolípido de carga neutra localizado en la cara externa de la membrana de las células (26, 27, 28). La FTC que es el fosfolípido más abundante de la cara externa del eritrocito se encuentra recubierta por sialoglicoproteínas que pueden ser removidas por enzimas proteolíticas tales como la tiolproteasa bromelina (Br) (29, 30). Los aFTC son en su mayoría de clase IgM, sin embargo, se han reportado autoanticuerpos naturales de clase IgG que están regulados por anticuerpos de clase IgM (31). Los anticuerpos de clase IgM son producidos principalmente, mas no exclusivamente, por células B Ly-1<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>) (32), un subgrupo de células B que expresa en su superficie el marcador conocido como CD5, que se pensaba era exclusivo de

linfocitos T. La proteína de membrana CD5 no está relacionada con el receptor de superficie para el antígeno del linfocito B. Las células B CD5<sup>+</sup> representan del 10-15% de los linfocitos circulantes y de bazo (33), y constituyen la mayoría de los linfocitos B del bazo fetal humano (34) y del cordón umbilical (35). A estas células se les ha atribuido la función de ser productoras de autoanticuerpos naturales de clase IgM (36). En ratones se ha determinado que las células B CD5<sup>+</sup> que producen aFTC se encuentran concentradas en la cavidad peritoneal (37), y en las cavidades pleuropéricárdicas (38). En estas cavidades las células B CD5<sup>+</sup> expresan un repertorio de anticuerpos diferente al de los linfocitos convencionales, lo cual aumenta la posibilidad de que la especificidad de estos anticuerpos dependa de un grupo particular de genes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Se ha propuesto que estas diferencias se deben a mecanismos de selección celular que operan específicamente en la población de células B CD5<sup>+</sup> o bien en ese sitio en particular.

El uso de un grupo de genes por los anticuerpos que muestran reconocimiento contra ERBr ha sido demostrado por diferentes autores (39, 40, 41). En el trabajo de Andrade y colaboradores (41), se muestra la distribución relativa de diez genes V<sub>H</sub> y siete V<sub>K</sub> con lo que los autores concluyen que la distribución es dependiente de la localización de las células, su interacción con el medio ambiente que las rodea y la edad de los individuos. A la fecha los genes conocidos que codifican para los autoanticuerpos naturales contra ERBr son: V<sub>H</sub> 81X (7183), V<sub>H</sub> 300-19 (Q52), V<sub>H</sub> S107 (S107), V<sub>H</sub> X24 (X24), V<sub>H</sub> PB14 (J606), V<sub>H</sub> P6-3R1 (30-60), V<sub>H</sub> PNP (V<sub>H</sub> 11) pertenecientes todos a la familia V<sub>H</sub> 11. De la familia V<sub>K</sub>, los que codifican para autoanticuerpos

naturales son: V<sub>k</sub>1, V<sub>k</sub>4, V<sub>k</sub>8, V<sub>k</sub>9, V<sub>k</sub>21, V<sub>k</sub>22 y V<sub>k</sub>23. Algunos de estos anticuerpos tienen reactividad cruzada contra otros fosfolípidos zwitteriónicos y/o aniónicos incluyendo cardiolipina (26).

Parece ser que en etapas tardías de la vida de ratones NZB, se incrementan los títulos de anticuerpos naturales contra FTC, fenómeno que coincide con un segundo brote de anemia hemolítica que los lleva a la muerte (42). Recientemente, nosotros describimos el caso de un paciente con anemia hemolítica y títulos altos de aCL de clase IgM con reactividad cruzada contra FTC (19). Los anticuerpos purificados de su plasma reconocieron ERBr y eritrocitos envejecidos *in vitro*. Este último hallazgo nos sugiere que los autoanticuerpos contra FTC pueden participar en la eliminación de eritrocitos envejecidos.

La noción de que los autoanticuerpos aFL pertenecen al grupo de los autoanticuerpos naturales se apoya en los siguientes hallazgos: primero, la identificación de un idiotipo relacionado con el idiotipo público 16/6 (43) en el suero de pacientes con SAFP (44). Los anticuerpos que portan dicho idiotipo son codificados por genes de línea germinal que sufren poca o ninguna mutación somática (45); segundo, se encontró además que algunos pacientes con SAFP tienen aumentado el número de células B CD5<sup>+</sup> circulantes (46), subgrupo de células B que es productor de autoanticuerpos naturales, demostrado esto último en modelos murinos.

### 3.2.2 Factores inmunogenéticos y aFL

En los familiares de pacientes con LEG se encontró una alta prevalencia de aFL (específicamente aCL), detectados por ELISA, comparados con la población normal no relacionada (47); aunado ésto a la presencia de aFL en los pacientes con LEG, que se encuentran relacionados con marcadores del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), particularmente con componentes del sistema del complemento en los que se ha reportado la presencia de alelos nulos tanto de C4A como de C4B (47, 48).

La asociación de aCL y HLA-DR7 se reportó también en pacientes con LEG del norte de Italia, en tanto que una asociación entre HLA-DR4 y aCL de pacientes con LEG fue reportada en un estudio pequeño realizado en Inglaterra (49). Los estudios anteriores reflejan las diferencias étnicas de la frecuencia de los genes HLA-DR entre dos poblaciones. Esto también puede reflejar la participación de los genes HLA-DRB4 debido a que ambos antígenos están contenidos en el DRw53 y portan la cadena DRB4.

En pacientes con SAFP de Inglaterra, se encontraron aumentados en frecuencia el DR4 y el DRw53. El DR3, DRw52a y la delección en el gen de C4A que están fuertemente asociados con LEG en pacientes caucásicos y en la población negra se encontraron disminuidos en ese estudio, lo cual apoya las diferencias en la predisposición genética cuando se comparan pacientes con LEG definido (50). El DQw7 en estos pacientes se encuentra aumentado, los autores sugieren que el incremento se debe a desequilibrio de unión entre el DR4-DRw53 y el DQw7, y que el locus DR está más fuertemente asociado que el DQB en pacientes con SAFP. Aún más,

el riesgo relativo tan alto en pacientes con SAFP esta dado por el alelo DRw53, el cual está presente en todos los pacientes con aCL positivos de este estudio, lo cual sugiere que este alelo puede jugar un papel directo en el desarrollo de respuesta autoinmune por fosfolípidos (50).

En un estudio realizado en pacientes mexicanos con SAFP y sus familiares de primer grado, se encontró que 17 de los 19 pacientes son positivos para HLA-DR2, DQw1 y/o DR5 en tanto que los otros dos son homocigotos para DR3 y DR4 (51). El DR5 se encontró significativamente aumentado en pacientes con SAFP, lo cual apoya la noción de que la cadena  $\beta$  del DR y DQ tiene secuencias relacionadas con la producción de aFL en estos pacientes. Recientemente el mismo grupo de investigadores tipificaron los genes DR $\beta$  y DQ $\beta$  de los 17 pacientes mexicanos con SAFP, por la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR) usando sondas de DNA complementario (52). La frecuencia de los genes HLA-DR5 y DRw52 estuvo significativamente aumentada en los pacientes con el SAFP al compararla con la frecuencia de estos alelos en los controles (200 haplotipos de sujetos normales). En el estudio se muestra que 14 de los 34 cromosomas de los pacientes presentaron el alelo DRw52 sin estar presente el DR5 lo que sugiere una participación independiente de los genes DR $\beta$ 1 y DR $\beta$ 3 en el desarrollo del SAFP.

Otros datos que apoyan la participación de factores inmunogenéticos en el desarrollo del SAF recide en el estudio de familias en las que se ha encontrado más de un miembro con el SAFP, así como el estudio de familias con un miembro con SAFP y otro u otros con LEG (53).

### **3.2.3 Des-regulación inmune y aFL**

La desregulación inmune trae como consecuencia una excesiva producción de autoanticuerpos, incluyendo los aFL, que es un punto cardinal en pacientes con LEG (54). En aquellos pacientes con SAFL puede también ocurrir desregulación inmune que puede ser diferente a la que ocurre en pacientes con LEG u otras enfermedades autoinmunes.

### **3.2.4 aFL como anticuerpos anti-Idiotipo**

El análisis serológico de idiotipos ha permitido incluir ciertos mecanismos en la generación de autoanticuerpos, a pesar de que el origen de esta respuesta aún no se define. Los estudios de las actividades biológicas de los idiotipos y sus anti-idiotipos han iluminado ciertos puntos en el desencadenamiento de las enfermedades autoinmunes. Shoenfeld y Mozes (55), mostraron que la inmunización de ratones normales con un anticuerpo monoclonal humano que porta el idiotipo 16/6 produjo una enfermedad con características clínicas, serológicas e inmunopatológicas iguales al LEG. Estudios posteriores demostraron que también un anticuerpo anti-Idiotipo puede producir el mismo fenómeno, lo que sugiere que la perturbación de la red idiotipo-anti-Idiotipo por un idiotipo patogénico o un anti-Idiotipo puede iniciar múltiples manifestaciones de LEG. Existen estudios relacionados con la respuesta proliferativa del 16/6 y del anti-16/6 en células T de pacientes con LEG, sus familiares y en sujetos controles. Los resultados sugieren que la alteración de la red del 16/6 también puede ocurrir en seres humanos con enfermedades autoinmunes (56, 57).

En modelos murinos se ha podido demostrar dramáticamente que la manipulación de una red de anti-idiotipos puede inducir la producción de autoanticuerpos (58). La regulación de la respuesta autoinmune por interacciones idiотipo-anti-idiotipo también ha sido demostrada (59).

La observación de idiotipos con reactividad cruzada entre los anticuerpos contra la proteína p24 gag del virus de inmunodeficiencia tipo 1 y los anticuerpos anti-Sm del suero de pacientes con LEG, sugiere, que el desarrollo de un proceso infeccioso juega un papel importante en la generación de una población idiotípica vía mimetismo molecular (60). Con la desregulación de éstos anticuerpos por un mecanismo de retroalimentación positiva, no dependiente de idiотipo, se puede intensificar y perpetuar la respuesta (61).

La posibilidad de que algunos aFL pueden ser anticuerpos anti-idiotipo de otros anticuerpos emerge a consecuencia del descubrimiento de un anticuerpo de cabra contra proteína C, un anticoagulante natural humano, que expresa idiotipos que son reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de sujetos normales y de pacientes con LEG. Estos anticuerpos anti-idiotipo contra anticuerpos de cabra anti-proteína C, también se comportan como aCL (62).

### **3.2.5 aFL Inducidos por fármacos**

A algunos pacientes que reciben tratamiento con clorpromazina se les han detectado títulos altos de aFL (63), este fármaco, puede inducir LEG (64), así como en



algunos casos, la producción de anticuerpos antinucleares en ausencia de manifestaciones clínicas de lupus o cualquier otra enfermedad autoinmune (65).

### **3.2.6 aFL Inducidos por infecciones**

El primer aFL reportado fue el relacionado con sífilis, que posteriormente se usó para el diagnóstico serológico de esta enfermedad. En procesos infecciosos virales también se ha podido demostrar el incremento en los títulos de aFL (66). En pacientes con el virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV), el incremento en los títulos de estos anticuerpos se ha atribuido a infecciones oportunistas (67, 68), sin embargo, Maclean y colaboradores proponen que el virus es por sí mismo capaz de inducir la producción de aFL (69).

### **3.3 Anticuerpos anti-fosfolípidos y anemia hemolítica**

En el trabajo publicado por Delezé y colaboradores se encontró una fuerte asociación entre la anemia hemolítica y aCL de clase IgM a títulos altos en pacientes con LEG (15). El papel patogénico de estos anticuerpos en la producción de la anemia hemolítica se ha hipotetizado pero aun no existe demostración directa. La razón por la cual se duda de que los aFL tengan un papel patogénico en la anemia hemolítica es el conocimiento de que los FL aniónicos se localizan en la cara interna de las membranas celulares y por lo tanto no quedan expuestos a dichos anticuerpos (16, 17). No obstante, se ha reportado que en eritrocitos que han sufrido algún daño en la integridad de sus fosfolípidos (FL) aniónicos puede exponerse en la cara externa de la

membrana celular (16) y de esta manera pueden dar origen a anticuerpos patogénicos que tienen capacidad de reconocer fosfolípidos zwitteriónicos por reacción cruzada (18).

En el trabajo de Cabral y colaboradores (19) se reporta un paciente con anemia hemolítica y aFTC unidos a sus eritrocitos en el momento de hemólisis activa. Los autores reportan además, que los anticuerpos eluidos de los eritrocitos reconocen eritrocitos de ratón tratados con bromelina (ERBr), y que al estar presentes las proteínas del complemento producen hemólisis. Los anticuerpos reconocen además eritrocitos almacenados, procedimiento que expone la FTC del eritrocito por pérdida de la capa sialoglicoprotéica que la recubre. Estos no son los primeros datos de la capacidad hemolítica de los aFL en el humano. En 1961 Jenkins y Marsh reportaron tres pacientes con anemia hemolítica y prueba serológica para sífilis falsa positiva, a los pacientes se les detectaron además, anticuerpos que reconocían eritrocitos almacenados y tratados con enzimas (20). Oken y colaboradores describieron un paciente con anemia hemolítica y prueba de Coomb's positiva, VDRL positivo, IgM sérica aumentada así como factor reumatoide positivo (21). Cooper y colaboradores reportaron un paciente con linfoma y antecedentes de anemia hemolítica quien desarrollo un anticuerpo monoclonal IgM, que debido a la reacción fuertemente positiva para VDRL se encontró que reconocen CL y FTC. Estos dos fosfolípidos junto con el colesterol forman el antígeno de la prueba de VDRL (22). Del Papa y colaboradores describieron un paciente con SAFR, anemia hemolítica y crioglobulinemia cuyos anticuerpos eluidos de sus eritrocitos presentaban reactividad cruzada con CL. El

isotipo de los anticuerpos detectados fué IgG y reconocían exclusivamente fosfolípidos con carga negativa (23).

### **3.4 Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SAF)**

La existencia del SAF como entidad clínica propia está cada vez más definida y delimitada. Diversas manifestaciones clínicas se correlacionan con la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos en suero y aún en otros fluidos biológicos como orina (8). Las manifestaciones clínicas incluyen una alta frecuencia de oclusiones vasculares que habfan sido originalmente observadas en pacientes con anticoagulante lúpico (AL) positivo y prueba serológica para sífilis falsa positiva (1, 9). Uno de los trabajos más extensos y con mayor número de pacientes estudiados es el elaborado por Alarcón-Ségovia y colaboradores en 1989 (10), en el que se estudiaron los aCL de 500 pacientes con LEG mediante ELISA, usando CL como antígeno. Las manifestaciones clínicas que se encontraron significativamente asociadas con la presencia de aFL a títulos altos fueron: trombosis venosas (particularmente las que se presentan en forma recurrente), trombocitopenia, anemia hemolítica, pérdida fetal repetida, livedo reticularis, úlceras en piernas, oclusiones arteriales, hipertensión pulmonar y mielitis transversa. Las tres últimas mostraron una asociación muy débil, al parecer debido a la baja frecuencia con la que se presentan en pacientes con LEG. Para definir mejor la significancia de la asociación los autores usaron dos estrategias, una de ellas fue el estudio de un número grande de pacientes con la manifestación clínica en cuestión (fuera del grupo de los 500 pacientes estudiados) y la otra fué el investigar la presencia de las manifestaciones en pacientes con SAFF.

También se han asociado la presencia de aFL con valvulopatía cardíaca (11) y con hipoadrenalismo que se ha encontrado en pacientes con SAFF (12). La corea no estreptocócica que también ha sido propuesta como relacionada a la presencia de aFL en LEG, pero no ha sido apoyada claramente en estudios mayores debido posiblemente a su baja frecuencia. Sin embargo, se ha visto que ocurre en pacientes con SAFF (13). Algunas manifestaciones clínicas se asocian preferentemente con aFL de clase IgG, como son la pérdida fetal repetida, la trombosis venosa y la trombocitopenia, en tanto que se asocian con aFL de clase IgM la anemia hemolítica, las úlceras en piernas, el livedo reticularis, la hipertensión pulmonar y la mielitis transversa.

Los pacientes con SAF pueden tener títulos altos de los aFL en forma persistente detectados por ELISA, aún cuando el ensayo de AL retorne a la normalidad. Ishii y colaboradores (14) analizaron un grupo de pacientes con LEG e identificaron dos subgrupos: uno que mostró persistentemente títulos altos de aFL y otros con incrementos eventuales pero generalmente con títulos bajos (normales) de los aFL. El subgrupo con aFL persistentemente altos presentan las manifestaciones clínicas asociadas al SAF, sin variación en los títulos del anticuerpo con la actividad de la enfermedad y una baja frecuencia de nefritis lúpica. El subgrupo con títulos intermitentemente altos presenta sólo algunos síntomas del SAF, los títulos de los anticuerpos aumentan con los períodos de exacerbación de la enfermedad y tienen una alta frecuencia de nefritis lúpica.

### 3.5 Epítopes reconocidos por los aFL

Los aCL tienen una amplia reactividad cruzada contra otros fosfolípidos de carga negativa (70). Esto es verdad particularmente en anticuerpos de clase IgG de pacientes con LEG, en tanto que, los anticuerpos de clase IgG de pacientes con sífilis, los de clase IgM de pacientes con LEG, SAFF y sífilis reconocen además FL zwitteriónicos (19, 71, 72). En algunos pacientes se han reportado aFL que reconocen fosfatidilanolamina (FTE), estos anticuerpos no muestran reactividad cruzada contra cardiolipina, por lo que se ha propuesto que el reconocimiento es específicamente de la *Liso*FTE, un producto de degradación de la FTE que tiene reactividad cruzada parcial con cardiolipina (73). El reconocimiento específico de la FTE es importante debido a que los anticuerpos que reaccionan contra este FL lo hacen cuando se encuentra en fase hexagonal II (que es una conformación espacial diferente a la que forma la capa lipídica), no existiendo reconocimiento del FL en la fase lamelar (74). Los fosfolípidos *in vivo* se disponen en fase lamelar (bicapa). Con ello se puede pensar que al tomar una conformación no usual los FL pueden ser patogénicos, lo que desencadena la respuesta inmune contra ellos.

Un estudio interesante en ratones realizado recientemente por Rauch y Janoff (75), mostró que la FTE en fase hexagonal es más inmunogénica que en fase lamelar en ausencia de adyuvantes. Los aFL resultantes de esta inmunización fueron fuertemente reactivos contra FTE, mostraron reactividad cruzada contra cardiolipina y tuvieron actividad funcional de AL. Otro punto importante relacionado con el epítipo involucrado en la reactividad de los aFL es la cabeza polar de los FL, que confiere la especificidad

de algunos anticuerpos. Esta especificidad también se ve afectada por la cadena de ácidos grasos. El reconocimiento de dicha cadena depende del tamaño de ésta (71). La importancia de la cabeza polar de los FL se ha observado tanto en anticuerpos derivados de pacientes con sífilis como en aquellos derivados de pacientes con LEG (76). Por otro lado existe el reporte de un estudio en el que se encontró que la unión de los aFL es dependiente de la cadena de ácidos grasos y requiere de cadenas de 14 átomos de carbono como mínimo (77).

De acuerdo a los estudios reportados por Pengo y colaboradores (78), es muy probable que no todos los anticoagulantes "Lúpicos" circulantes sean el mismo aFL. En un estudio en el que se fraccionó el plasma de dos pacientes con títulos altos tanto de aFL como de AL se encontró, que cada una de las actividades se localizaron en fracciones diferentes (79). Valesini y colaboradores aislaron anticuerpos aCL y encontraron que estos prolongaban el tiempo parcial de tromboplastina activada de forma dosis-dependiente (80). En otro estudio se encontró que 15 sueros con AL positivo tuvieron aFTE y fueron inhibidos en el reconocimiento de éste FL con tromboplastina. Sin embargo, la mayoría mostró reactividad cruzada con CL (81).

Se ha observado que la reactividad cruzada es principalmente entre FL cargados negativamente y DNA de cadena simple (DNACs) pudiendo extenderse al reconocimiento de plaquetas y células endoteliales (82, 83).

Dos grupos diferentes han reportado simultáneamente que los anticuerpos purificados por afinidad contra FL cargados negativamente, no reconocen CL pegada a placas de ELISA a menos que exista en el sistema plasma o suero (84, 85). Este no

es el caso para los anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos zwitteriónicos (19, 79). Posteriormente se investigó la posible participación de un cofactor sérico, que se identificó como  $\beta_2$ glicoproteína-I ( $\beta_2$ GP-I) también conocida como apolipoproteína H (84), la cual forma complejos con compuestos aniónicos incluyendo FL de carga negativa. La formación del complejo  $\beta_2$ GP-I-FL aniónico parece ser requerida para que los anticuerpos contra FL de carga negativa reconozcan al FL, cuando menos en sueros de pacientes con LEG (86). El cofactor tiene fuerte afinidad por FL aniónicos y no por FL de carga neutra y se comporta como acarreador proteico de compuestos de carga negativa incluyendo los fosfolípidos. La existencia de anticuerpos contra la  $\beta_2$ GP-I en ausencia de FL aniónicos es controversial (85, 85). El papel fisiológico que se ha atribuido a la  $\beta_2$ GP-I de acuerdo al trabajo reportado por Schousboe en 1985, es el de anticoagulante natural (87), por lo tanto, la existencia de un anticuerpo que pueda reconocerla cuando se encuentra unida a FL sugiere que puede tener efectos protrombóticos.

### **3.6 Heterogeneidad funcional e inmunoquímica de los aFL**

La mayoría de los aCL tiene reactividad cruzada con otros FL aniónicos, sin embargo, sólo algunos reconocen también FL zwitteriónicos. Esta reactividad puede estar relacionada con el isotipo del anticuerpo, de ésta manera tenemos que anticuerpos contra FL aniónicos pueden ser de clase IgG o IgM en tanto que anticuerpos contra FL zwitteriónicos son con mayor frecuencia IgM. En la tabla 1 se

muestra la clasificación de los FL de acuerdo a su carga y al isotipo de los anticuerpos reactivos contra cada uno de ellos.

TABLA 1. Carga de los FL e isotipo de los aFL

Fosfolípidos	Isotipo
Aniónicos	
<i>Cardiolipina (aCL)</i>	<i>IgG, IgM</i>
<i>Fosfatidilserina (FTS)</i>	<i>IgG, IgM</i>
<i>Fosfatidilinositol (FTI)</i>	<i>IgG, IgM</i>
Zwitteriónicos	
<i>Fosfatidilcolina (FTC)</i>	<i>IgM</i>
<i>Fosfatidiletanolamina (FTE)</i>	<i>IgG, IgM</i>
<i>Esfingomielina (EM)</i>	<i>IgG, IgM</i>

Tomado de la referencia número 89

Como ya se mencionó, los aCL requieren de la  $\beta_2$ GP-I para ser detectados en el ELISA. Esta regla se cumple para los aCL presentes en el suero de los pacientes con LEG y en el suero de los pacientes con SAFR, lo que sugiere, que el requerimiento de la  $\beta_2$ GP-I puede ser un marcador de patogenicidad potencial de los aCL de clase IgG. El requerimiento del cofactor no necesariamente en un fenómeno de todo o nada. Algunos sueros pueden tener aCL detectables en ausencia del cofactor y con la adición de  $\beta_2$ GP-I el reconocimiento del anticuerpo puede incrementarse (89). De ésta manera, en la mezcla policlonal de aFLs presentes en un suero, pueden existir tres tipos de anticuerpos, aquellos que requieren del cofactor para reconocer a los FL aniónicos, aquellos que en presencia del cofactor se incrementa su reconocimiento y aquellos que no requieren del cofactor.

Existen aFL tanto de clase IgG como de clase IgM que pueden ser detectados también porque producen prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada



(TPTA), sin corregir con la adición de plasma normal. Esto indica, que está presente un inhibidor (AL) más que una deficiencia de factores de la coagulación. Algunos de los AL tienen reactividad cruzada contra CL en el ELISA. Por otro lado, también se han reportado sueros en los que existe tanto el AL como los aCL, que no muestran reactividad cruzada. Bevers y colaboradores han demostrado que algunos de los aFL de clase IgG requieren de protrombina más que de  $\beta_2$ GP-I como cofactor para reaccionar con FL (90). Se desconoce aún si los aFL de clase IgM con actividad AL requieren o no de la protrombina como cofactor.

Los anticuerpos contra FL zwitteriónicos son principalmente y en algunas instancias, exclusivamente de clase IgM (89, 19). Tal es el caso de los anticuerpos reportados contra FTC que son todos de clase IgM (89). La reactividad cruzada que muestran estos anticuerpos con CL fué lo que permitió su detección.

En experimentos realizados por Reininger y colaboradores en los que se inocularon ratones irradiados, con células B de ratones NZB de diferentes edades, se encontró que las células provenientes de ratones viejos producen más anticuerpos contra EBr, éste fenómeno coincide con el desarrollo de anemia hemolítica que lleva a la muerte a los ratones receptores (91). Por lo tanto, los autoanticuerpos naturales pueden ser patogénicos tanto en ratones como en el hombre. Recientemente se ha identificado un grupo de pacientes con una variante del SAF que se manifiesta principalmente por el desarrollo de anemia hemolítica (92) y la presencia de aFTC, esta manifestación se ha identificado también en pacientes con SAFF (89) y en pacientes con LEG (93).

Alarcón-Segovia y Cabral propusieron una clasificación de los aFL, que ayuda a describir a los nuevos aFL y permite caracterizar mejor a los ya conocidos (tabla 2).

**TABLA 2. Clasificación de los aFL**

- 
- I. aFL reactivos contra fosfolípidos aniónicos**
- A. Reconocen CL en el ELISA (aCL)**
- 1.- Requieren de  $\beta_2$ GP1 como cofactor
  - 2.- No requieren de  $\beta_2$ GP1 como cofactor
- B. Con actividad AL**
- 1.- Requieren de trombina como cofactor
  - 2.- No requieren de trombina como cofactor
- C. aCL con actividad de AL**
- II. aFL reactivos contra fosfolípidos zwitteriónicos**
- A. Reactivos contra FTC en el ELISA y con eritrocitos tratados con bromelina**
- 1.- Con reactividad cruzada contra CL en el ELISA
  - 2.- Sin reactividad cruzada contra CL en el ELISA
- B. Reactivos contra otros fosfolípidos zwitteriónicos**
- 

Tomado de la referencia número 88

La clasificación se apoya en los siguientes puntos: 1) los aFL's más que un simple anticuerpo constituyen una familia de autoanticuerpos; 2) un aFL puede tener reactividad cruzada con otros fosfolípidos, así como con otros antígenos (v.g. DNA, vimentina); 3) en el suero de un paciente puede haber una mezcla de varios tipos de aFL con características inmunoquímicas y propiedades biológicas diferentes; 4) algunos aFL pueden ser autoanticuerpos codificados por genes de línea germinal, en tanto que otros pueden ser dirigidos por antígeno y sufrir mutaciones o hipermutaciones somáticas; y 5) aun cuando sean codificados por genes de línea germinal contra un sólo fosfolípido puede haber heterogeneidad de reconocimiento debida a la participación de diversos genes que codifican para los fragmentos que constituyen los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de los aFL.

#### **4. HIPOTESIS**

La existencia en personas normales de anticuerpos contra fosfatidilcolina que tienen reactividad cruzada con estructuras conservadas filogenéticamente y que participan posiblemente en los mecanismos de depuración de células coloca a los aFTC dentro de la familia de los autoanticuerpos naturales.

#### **5. OBJETIVOS**

- 1.- Determinar si existen anticuerpos contra fosfatidilcolina en una población humana normal (estudio de 100 sujetos sanos).
- 2.- Determinar el isotipo del anticuerpo.
- 3.- Determinar si el anticuerpo tiene reactividad cruzada con otros fosfolípidos u otros antígenos.
- 4.- Determinar el epítipo que reconocen los anticuerpos contra fosfatidilcolina.
- 5.- Determinar si los anticuerpos contra fosfatidilcolina son fijadores de complemento y por tanto pueden ser hemolíticos.

## 6. MATERIALES Y METODOS

**6.1 ELISA para detectar aFTC.** Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Inc, Danemark 97F 4-39454) con 50  $\mu$ l de fosfatidilcolina (SIGMA Chemicals Co, St Louis MO.) a una concentración de 50  $\mu$ g/ml, disuelta en alcohol etílico (J. T. Baker). El etanol se evaporó con nitrógeno gas durante 30 minutos, cambiando de posición la placa para que el nitrógeno calga directamente sobre los pozos. Una vez secada la placa, se bloquearon los sitios inespecíficos con 350  $\mu$ l de una solución al 10% de suero bovino fetal (SBF, SIGMA) en PBS (NaCl 0.15M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01M pH 7.4) 2 horas a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces, se secaron mediante golpeteo contra una superficie absorbente y se guardaron toda la noche a 4 °C.

La dilución de los sueros (1:5) se hizo en SBF al 10% en PBS y se congelaron toda la noche. A la mañana siguiente las diluciones se incubaron a 37 °C para descongelarlas y las placas se pusieron a TA por cuando menos 15 minutos. Se pusieron 100  $\mu$ l de cada muestra por duplicado. La aplicación de las muestras debe hacerse en el menor tiempo posible ya que la incubación empieza al aplicar la primera muestra. Se incubaron las placas por una hora a TA. Se lavaron las placas 3 veces, con incubaciones de 3 minutos y se secaron mediante golpeteo.

El anticuerpo anti-humano marcado con la enzima fosfatasa alcalina fue específico contra IgG o IgM (anticuerpo anti-cadenas gama o  $\mu$ , SIGMA). Se utilizó siempre una dilución 1:1000 en SBF 10%/PBS. Los títulos del anticuerpo marcado se monitorizaron periódicamente. Las placas con el segundo anticuerpo se incubaron por una hora a TA. Transcurrida la incubación se hicieron 3 lavados de 3 minutos cada uno y se secaron las placas como se mencionó anteriormente. Se utilizó el p-nitrofenilfosfato (SIGMA) como sustrato de la enzima, disuelto en solución amortiguadora de glicina (Glicina 0.1M,  $\text{MgCl}_2$  0.001M,  $\text{ZnCl}_2$  0.001M pH 10.9) a una concentración de 1 mg/ml. Se adicionaron 200  $\mu$ l por pozo de la solución anterior y se incubaron las placas a 37°C una hora en la oscuridad y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en lector de microELISA (Titertek Multiskan, Organon Teknika, Helsinki Finlandia).

**6.2 ELISA para detectar anticuerpos contra DNA.** Los anticuerpos contra DNA se midieron de acuerdo a la técnica reportada por Koike (94) con algunas modificaciones. Se sensibilizaron placas de polipropileno de 96 pozos (Nunc) con 100  $\mu$ l de albúmina sérica bovina metilada (ASB-M) (SIGMA) a una concentración de 0.1% en PBS, las placas se incubaron durante 2 horas a TA. Transcurrida la incubación se descartó la solución de ASB-M y se adicionaron 50  $\mu$ l de DNA nativo o desnaturalizado (DNA de timo de ternera, SIGMA) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml de PBS que contiene EDTA 1mM (PBS-EDTA) y se incubó por una hora a TA. El DNA de cadena simple o desnaturalizado se obtuvo calentando el DNA de timo de ternera a 100 °C por 10 minutos. Después de tres lavados con PBS-EDTA se adicionaron 300  $\mu$ l por pozo de SBF al 10% en PBS-EDTA (PBS-EDTA-SBF) para bloquear los sitios inespecíficos y se incubaron las placas durante una hora a TA. Posteriormente se lavaron las placas 5 veces con aproximadamente 300  $\mu$ l de PBS-EDTA que contiene 0.05% de Tween 20 (BIO-RAD). Las muestras se diluyeron en PBS-EDTA-SBF, a una concentración de 1:5, además en cada placa se incluyó una curva de diluciones seriadas del suero de un paciente con LEG cuyos títulos de anticuerpos anti-DNA habían sido estudiados por la técnica de Farr (radioinmuno análisis). A cada pozo y por duplicado se adicionaron 100  $\mu$ l de la dilución y se incubó una hora a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBS-EDTA-Tween las placas se secaron mediante golpeteo contra una superficie absorbente. Se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo del segundo anticuerpo anti-inmoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina (específico de cadenas gama o  $\mu$ , SIGMA) disuelto en PBS-EDTA-SBF a una concentración de 1:1000 y se incubaron las placas nuevamente una hora a TA. Nuevamente se lavaron las placas 5 veces con 300  $\mu$ l de PBS-EDTA-Tween y se secaron como se mencionó anteriormente. Por último se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo del sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato, SIGMA) disuelto en amortiguador de dietanolamina (dietanolamina 10%,  $\text{MgCl}_2$  0.0005M pH 9.8) y se incubaron a 37°C por una hora a TA.

Se adicionaron 50 µl de una solución de NaOH 3N para detener la reacción y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en lector de microELISA (Titertek Multiskan).

**6.3 ELISA para detectar factor reumatoide (FR).** Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc) con 100 µl/pozo de una solución de IgG humana (SIGMA) cuya concentración era de 10.8 µg/ml y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavaron las placas tres veces con aproximadamente 300 µl de PBS con albúmina sérica bovina (SIGMA) al 1% y Tween-20 (BIO-RAD) al 0.05% (PBS-ASB-Tween), en cada lavado se agitaron las placas uno o dos minutos para eliminar perfectamente el material que no se adhirió. Los sueros se diluyeron 1:5 en PBS-ASB-Tween. 100 µl/pozo de las diluciones de los sueros se adicionaron por duplicado en la placa. Como control del ensayo se incluyó una curva dosis-respuesta de un suero con FR(+) detectado por la prueba de latex a las siguientes diluciones: 1:5120, 1:10240, 1:20480, 1:40960, 1:81920 y 1:163840. Las placas con las muestras se incubaron por dos horas a TA. Después de la incubación las placas se lavaron tres veces como se mencionó anteriormente. Se adicionaron 100 µl del anticuerpo anti-humano conjugado con fosfatasa alcalina (específico contra la cadena µ humana, SIGMA), a una dilución de 1:600 en PBS-ASB al 0.5%. Las placas con el segundo anticuerpo se incubaron por una hora a TA. Se hicieron tres lavados con 300 µl de PBS-ASB-Tween agitando durante cada lavado dos minutos. Por último se adicionaron 100 µl/pozo del sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato, SIGMA) disuelto en amortiguador de dietanolamina (dietanolamina 10%, MgCl<sub>2</sub> 0.0005M pH 9.8) y se incubaron a 37°C por una hora a TA. Se adicionaron 50 µl de una solución de NaOH 3N para detener la reacción y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en lector de microELISA (Titertek Multiskan).

**6.4 Adsorción de sueros con GRr.** La sangre fresca heparinizada (1:1000 heparina-sangre) de ratones BALB/c se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos para retirar el plasma, se lavó tres veces el paquete de eritrocitos (GRr) con PBS y se llevó a una concentración de 20%. 100 µl de la suspensión de eritrocitos al 20% se colocaron en tubos de vidrio los cuales se centrifugaron a 600 g por 10 minutos y se les quitó el sobrenadante. Al paquete de eritrocitos se le adicionaron 300 µl del suero concentrado que se ensayó posteriormente contra eritrocitos tratados con bromelina. Se homogeneizó suavemente el paquete de eritrocitos con el suero y se incubó por 30 minutos a 37°C. Transcurrida la incubación se centrifugó a 600 g por 10 minutos, se tomó el sobrenadante (suero adsorbido) y se depositó en otro tubo que contenía el paquete eritrocitario de 100 µl de la suspensión al 20% de eritrocitos, se homogeneizó y se incubó 30 minutos. Se hicieron tres adsorciones a cada suero y terminadas éstas, los sobrenadantes (sueros adsorbidos) se guardaron a -20°C hasta su uso.

**6.5 Eritrocitos de ratón tratados con bromelina.** Se lavó sangre fresca heparinizada (1:1000 heparina-sangre) de ratones BALB/c con PBS tantas veces como fue necesario para dejar el sobrenadante claro (sin restos de hemoglobina). El paquete celular se llevó a una concentración de 20% en PBS.

La bromelina (SIGMA) se preparó a una concentración de 10% en PBS, con ésta concentración se hicieron alícuotas de 1 ml en criotubos y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para tratar con bromelina a los eritrocitos se siguió la técnica descrita por Cabral y colaboradores (19). Se descongeló un vial de bromelina y se llevó a 10 ml con PBS. Se agregó la bromelina v/v a la suspensión de eritrocitos (concentración final: eritrocitos 10% y bromelina 5%). Se incubó la mezcla 30 minutos a 37°C con agitaciones ocasionales. Después de la incubación se lavaron los eritrocitos dos veces con PBS y se llevaron a una concentración del 10% con el mismo amortiguador. De ésta última suspensión de eritrocitos, se tomaron 100 µl y se depositaron en tubos de poliestireno de 12 X 75 mm (FALCON, Beckton-Dickinson, Mountain View, CA.) que contenían 3 ml de PBS, se homogeneizaron y centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante. El paquete celular se homogeneizó suavemente y se le agregaron 100 µl de la dilución 1:5 de los sueros preadsorbidos. Se homogeneizó la suspensión, se incubó a 37°C por una hora con agitación ocasional y toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se lavaron 3 veces los eritrocitos con 3 ml de PBS cada vez. En el último lavado se retiró perfectamente el sobrenadante, se homogeneizó el paquete y se le agregaron 100 µl de anticuerpo

anti-humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (específico contra la cadena  $\mu$  o gama marcado con FITC, SIGMA) diluido 1:120 en PBS. Se incubó 30 minutos a 37 °C con agitación ocasional. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron los eritrocitos 3 veces como se mencionó anteriormente y se retiró cuidadosamente el sobrenadante del último lavado. Se homogeneizó el paquete de eritrocitos y se le agregaron 500  $\mu$ l de PBS filtrado (para evitar lecturas falsas en el citofluorógrafo de flujo). Nuevamente se homogeneizó la suspensión y se leyó en un citofluorógrafo de flujo (FACS, Becton-Dickson). El reconocimiento de la FTC expuesta con el tratamiento enzimático se inhibió incubando los sueros diluidos 1:2.5 V/V con micelas del fosfolípido. La inhibición se calculó de acuerdo a la fórmula siguiente y se expresa como porcentaje de inhibición.

$$100 - \frac{\% \text{ de células que presentan el anticuerpo marcado con FITC en presencia del FL}}{\% \text{ de células que presentan el anticuerpo marcado con FITC en ausencia del FL}} \times 100$$

**6.6 Inhibición de los aFL con micelas de FL.** Las micelas de los fosfolípidos (FL) se prepararon de acuerdo a la técnica descrita por Cabral y colaboradores (19). Dos mg de FL disueltos en etanol (o el solvente orgánico en el que se encuentre) se depositaron en un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml y se evaporó el solvente con nitrógeno líquido. El FL se resuspendió en 1 ml de PBS-SBF al 10% que contenía 1  $\mu$ l de Tween 20, se depositó en un tubo de polipropileno (12 X 75, ELKAY) y se homogeneizó por 15 minutos (en un homogeneizador automático, Vortex). La suspensión se centrifugó a 600 g por 15 minutos a 4°C y se homogeneizó nuevamente 15 minutos. La suspensión de micelas de FL debe usarse inmediatamente después de su preparación.

La suspensión de micelas se agregó V/V con la dilución 1:2.5 de los sueros para llevar a una concentración final de micelas de 1 mg/ml y de suero de 1:5. Esta nueva suspensión se homogeneizó suavemente y se incubó a 37°C una hora y a 4°C toda la noche. A la mañana siguiente se centrifugó la suspensión a 600 g por 1 hora a 4°C (para bajar los complejos Ag-Ac, que en este caso son FL-aFL). A los sobrenadantes se les hicieron los estudios necesarios para demostrar la ausencia del aFL (ELISA para aFL) y a los sedimentos se les estudió la presencia de anticuerpos (determinación de proteínas y Dot blot). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$100 - \frac{DO_{405} \text{ de los sueros incubados con micelas}}{DO_{405} \text{ de los sueros incubados sin micelas}} \times 100$$

**6.7 Ensayos de competencia.** Los ensayos de competencia por el antígeno se usaron para definir la especificidad o especificidades de los sueros probados. Los sueros se incubaron a una dilución final de 1:5 con concentraciones decrecientes (a partir de aquella concentración que eliminó por completo al anticuerpo) de los siguientes antígenos: micelas de FL (partiendo de 1mg/ml), gamaglobulina agregada (GGA), DNACd (concentración inicial 1mg/ml), DNACs (concentración inicial 1mg/ml) y vimentina (concentración inicial  $1.5 \times 10^3$   $\mu$ g/ml). La GGA se preparó de la siguiente manera: A 50 mg de la fracción II de Cohn (SIGMA) se le adicionó 1 ml de PBS y se calentó a 63 °C por 30 minutos. Se dejó enfriar a TA y se homogeneizó en un homogeneizador con pistilo de teflón (Thomas Scientific). Esta emulsión se almacenó a -20°C. Para usarse se centrifugó a 18,000 g por 5 minutos y se tomó sólo el sobrenadante. La incubación fue de una hora a 37°C y toda la noche a 4°C. Al día siguiente los sueros se pusieron a 37°C por 15 minutos y se ensayaron para cada antígeno contra todos los antígenos.

**6.8 Ensayo hemolítico.** Sangre fresca heparinizada (1:1000 heparina-sangre) de ratones BALB/c se lavó con PBS tantas veces como fué necesario para dejar el sobrenadante claro (sin restos de hemoglobina). El paquete celular se llevó a una concentración de 20% en PBS. Para tratar con bromelina a los eritrocitos se siguió la técnica descrita por Cabral y colaboradores (19). Se descongeló un vial de bromelina y se llevó a 10 ml con PBS. Se agregó la bromelina v/v a la suspensión de eritrocitos (concentración final: eritrocitos 10% y bromelina 5%). Se incubó la mezcla 30 minutos a 37°C con agitaciones ocasionales. Después de la incubación se lavaron los eritrocitos dos veces con PBS y se llevaron a una concentración del 10% con el mismo amortiguador. De esta última suspensión de eritrocitos se tomaron 100 µl y se depositaron en tubos de vidrio de 12 X 75 mm, que contenían 3 ml de PBS, se homogeneizaron y centrifugaron a 600 g por 10 minutos y se retiró el sobrenadante. El paquete celular se homogeneizó suavemente y se le agregaron 100 µl de la dilución 1:5 de los sueros preadsorbidos, 500 µl de PBS y 50 µl de suero de conejo (como fuente de complemento, BIOTEST Diagnostics). Se homogeneizó la suspensión, se incubó 30 minutos a TA, se centrifugó a 600 g por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se leyó a 540 nm. La hemólisis inespecífica se obtuvo de la siguiente manera: 100 µl de la suspensión al 10% de eritrocitos se depositaron en tubos de vidrio de 12X75 mm que contenían 3 ml de PBS. Se homogeneizó suavemente y se centrifugó a 600 g por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se homogeneizó nuevamente con suavidad. Se agregaron 600 µl de PBS y 50 µl de suero de cobayo, se incubó y leyó como las demás muestras. La hemólisis total se obtuvo de 100 µl de la suspensión al 10% de eritrocitos que se centrifugaron y se les retiró el sobrenadante. A este paquete celular se le adicionó 650 µl de H<sub>2</sub>O<sub>20</sub>, se homogeneizó, incubó y leyó como las demás muestras. El porcentaje de hemólisis se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{DO}_{540} \text{ del sobrenadante de los ERBr con la dilución de los SHN} - \text{DO}_{540} \text{ del sobrenadante de los ERBr sin la dilución de los SHN}}{\text{DO}_{540} \text{ del tubo con la hemólisis total}} \times 100$$

Se realizó además un ensayo de inhibición de la hemólisis, en el que se agregaron los sueros preadsorbidos con micelas de FTC. La inhibición de la hemólisis se calculó comparando las DO<sub>540</sub> de los sueros inhibidos con FTC con la de los sueros no inhibidos.

**6.9 Detección de anticuerpos antinucleares (AAN) y anticitoplásmicos (AAC) por inmunofluorescencia indirecta (IFI).** Como sustrato para la detección de los AAN y AAC se emplearon la línea celular HEP-2 (de carcinoma de laringe humano) y una cepa celular de fibroblastos humanos sanos. Las células crecidas en cajas de cultivo (de 75 cm<sup>2</sup>) con medio mínimo esencial (MEM, GIBCO), suplementado con SBF (SIGMA) al 10%, L-Glutamina (SIGMA) 2.8X10<sup>-3</sup> mM, penicilina (SIGMA) 10 U/ml, estreptomycin (SIGMA) 0.01 µg/ml, bicarbonato de sodio (J.T. Baker) 20 µg/ml y HEPES (GIBCO, BRL Gaithersburg MD) 10mM, se propagaron en cajas de Petri que contenían 5 portaobjetos cubiertos con 35 ml del mismo medio. Cuando en los portaobjetos se observó una monocapa confluyente de células se retiraron del medio de cultivo, se secaron a TA y se fijaron con acetona pura a -20°C por 4 minutos. Los portaobjetos con las células fijadas se guardaron a -70°C hasta su uso.

Los portaobjetos se dejaron descongelar a TA y se delimitaron los círculos en donde se aplican las muestras primero con lápiz diamante y luego con lápiz cera. Se aplicaron 10 µl de la dilución de los sueros 1:5 en los círculos y se incubó la laminilla a TA en cámara húmeda por 30 minutos. Se hicieron dos lavados con PBS de 10 minutos cada uno y se dejó secar a TA. Se depositaron 10 µl de segundo anticuerpo (anti-humano específico contra cadenas gama o µ, marcado con con FITC, SIGMA) diluido 1:600 en PBS que contenía azul de Evans (Behringwerke AG, Marburg Lahn RFA) a una dilución de 1:100 y se incubó 30 minutos a TA en cámara húmeda. Se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS y se dejó secar la laminilla. Para eliminar la refringencia se le agregó glicerol (J.T. Baker SA de

CV Xalostoc México) antes de colocar el cubreobjetos. La lectura se hizo con microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

**6.10 Determinación del epítipo reconocido por los aFTC.** Las placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc 97F 4-39454) se sensibilizaron con 50  $\mu$ l de fosfatidilcolina (SIGMA) a una concentración de 50  $\mu$ g/ml, disuelta en alcohol etílico (J. T. Baker). El etanol se evaporó con nitrógeno gas en aproximadamente 30 minutos. Una vez seca la placa se bloquearon los sitios inespecíficos con 350  $\mu$ l de una solución al 10% de suero bovino fetal (SIGMA) en PBS (NaCl 0.15M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01M pH 7.4) se incubaron las placas por 2 horas a temperatura ambiente (TA), después de las cuales se lavaron las placas 3 veces en forma consecutiva, se secaron y se guardaron toda la noche a 4 °C.

Los sueros se diluyeron 1:2.5 en PBS/SBF al 10% y se mezclaron V/V con las siguientes soluciones por separado: 1) micelas de FTC (SIGMA) a una concentración de 2 mg/ml en PBS/SBF al 10%; 2) Fosforilcolina (SIGMA) a una concentración de 2 mg/ml en PBS/SBF al 10%; 3) micelas de ácido fosfatídico (SIGMA) a una concentración de 2 mg/ml en PBS/SBF al 10%; 4) una solución de trimetilamonio (SIGMA) a una concentración de 2 mg/ml, albúmina sérica bovina al 0.1% en PBS/SBF al 10% y 5) una solución de acetil colina (SIGMA) a una concentración de 2 mg/ml. Se incubó por una hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C. Las mezclas del suero más inhibitor se aplicaron por duplicado en las placas sensibilizadas con FTC y se incubaron a TA. Se lavaron las placas 3 veces y se secaron. El anticuerpo anti-humano marcado con la enzima fosfatasa alcalina fue específico contra IgM (anticuerpo anti-cadena  $\mu$  humana, SIGMA). Se utilizó siempre una dilución 1:1000 en SBF 10%/PBS. Las placas con el segundo anticuerpo se incubaron por una hora a TA. Transcurrida la incubación se hicieron 3 lavados de 3 minutos cada uno y se secaron las placas como se mencionó anteriormente. Se utilizó el p-nitrofenilfosfato (SIGMA) como sustrato de la enzima, disuelto en solución amortiguadora de glicina (Glicina 0.1M,  $\text{MgCl}_2$  0.001M,  $\text{ZnCl}_2$  0.001M pH 10.9) a una concentración de 1 mg/ml. Se adicionaron 200  $\mu$ l por pozo de la solución anterior y se incubaron las placas a 37°C una hora en la oscuridad. Se adicionaron 50  $\mu$ l de una solución de NaOH 3N para detener la reacción y posteriormente se midió la densidad óptica a 405 nm en lector de microELISA (Titertek Multiskan).

Se determinó también el reconocimiento de los antígenos con los que se inhibió la unión a FTC por detección de estos en fase sólida, para lo cual, se sensibilizaron placas con cada uno de los antígenos con las siguientes condiciones: 1) FTC, 50  $\mu$ l/pozo de una solución de 50  $\mu$ g/ml disuelta en etanol; 2) ácido fosfatídico 50  $\mu$ l a la misma concentración en el mismo solvente; 3) fosforilcolina mismas condiciones; y 4) para el trimetilamonio las placas se presensibilizaron con ASB al 0.1% y se incubaron por 2 horas a TA, se decantó la solución de albúmina y se adicionó la solución de trimetilamonio a una concentración de 50  $\mu$ g/ml. Se incubó toda la noche y se decantó la solución. Todas las placas se bloquearon como se mencionó anteriormente y se corrió el ensayo para FTC por ELISA descrito arriba.

**6.11 Determinación de la reactividad cruzada de los aFTC contra vimentina e identificación por inmunopunto (DOT BLOT) del isotipo de inmunoglobulina absorbida por las micelas de FTC.** Cuadrados de 2 cm de lado de papel de nitrocelulosa (BA85 0.45  $\mu$ m, Schleicher & Schuell) se activaron con amortiguador de transferencia (Glicina 0.192M, Trizma base 0.025M y Metanol 20% en  $\text{H}_2\text{O}_{\text{D}}$ ) por 15 minutos y se dejaron secar a TA. Se hicieron tres aplicaciones, en un sólo punto, de 5  $\mu$ l cada una, de vimentina (SIGMA) de concentración 1.5 mg/ml o del eluido de las micelas de FTC. Entre cada aplicación se le dejó secar perfectamente. Cada cuadrado de papel de nitrocelulosa se bloqueó una hora con leche descremada (Carnation) al 3% en PBS. Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS 0.05% de Tween 20 (BIO RAD) con agitación constante. Posteriormente se aplicaron los sueros por separado a una concentración de 1:5 en PBS/leche al 3%, se incubó por 2 hora a TA con agitación constante. Se lavó tres veces como se mencionó anteriormente y se adicionó el segundo anticuerpo anti-humano marcado con fosfatasa alcalina (específico de la cadena  $\mu$ , SIGMA) diluido 1:500 en PBS/leche al 3% y se incubó a TA con agitación constante por una hora. Se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween y un lavado de 10 minutos con amortiguador de Tris (Trizma base 0.05M pH 8.8). El sustrato revelador (Naphthol AS-MX phosphato de SIGMA a una concentración de 1 mg/ml y Fast Red SIGMA a una concentración de 2 mg/ml en amortiguador de tris) se preparó durante el último lavado



y se aplicó sobre el papel de nitrocelulosa permitiendo que esta solución cubra bien al papel. Se incubó aproximadamente 30 minutos a TA con agitación constante, hasta que el control positivo mostró una coloración bien definida. Finalmente se lavó con agua destilada desionizada.

**6.12 Electroinmunotransferencia (Western Blot) de vimentina.** Para la determinación de la reactividad de los sueros normales contra vimentina se corrieron geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10% con la técnica descrita por Laemmli (95). Las concentraciones de los amortiguadores tanto de corrimiento como de transferencia se hicieron como lo indica el fabricante del equipo de electroforesis y electrotransferencia (LKB 2050 Midget Electrophoretic Unit y LKB 2051 Midget multiblot Electrophoretic Transfer Unit).

**Soluciones:**

A. Solución stock de acrilamida.- Acrilamida (BIO RAD Laboratories Richmond CA.) 29.1% peso/volumen (P/V), NN'-Metilfenilbis-acrilamida (BIO RAD) 0.9% (P/V). Guardada en botella ámbar y a 4°C dura 2 semanas.

B. Amortiguador de Tris-HCl pH 8.8.- Tris-HCl (SIGMA) 1.875 M pH 8.8. A 4°C dura 4 semanas.

C. Amortiguador de Tris-HCl pH 6.8.- Tris-HCl (SIGMA) 1.25 M pH 6.8. A 4°C dura 4 semanas.

D. Solución de SDS.- Dodecil sulfato de sodio (SDS, BIO RAD) al 10% P/V en agua destilada desionizada ( $H_2O_{DD}$ ). A Temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) dura 4 meses.

E. Solución de persulfato de amonio.- Persulfato de amonio (BIO RAD) al 10% en  $H_2O_{DD}$ . Preparar fresco.

F. Amortiguador de tanque Tris-Glicina 10X.- Glicina (SIGMA) 14.42%. Trizma Base (SIGMA) 3.03% y SDS al 1.0% en  $H_2O_{DD}$ . A temperatura ambiente la solución dura 2 meses. Para usarse se diluyó uno a diez en  $H_2O_{DD}$ .

G. Amortiguador de muestra.- Tris-HCL (SIGMA) 1.25 M pH 6.8, SDS (SIGMA) 1.0%,  $\beta$ -Mercapto-etanol (SIGMA) 5% V/V, Glicerol (J.T. Baker) 11.6% V/V, azul de bromofenol (SIGMA) 0.01%

El gel separador al 10% de acrilamida se preparó de acuerdo a la siguiente formulación: 5 ml de solución A, 6.8 ml de  $H_2O_{DD}$  y 3 ml de solución B. La mezcla se degasificó poniéndola en un matraz Kitasato y sometiéndola a vacío por 15 minutos. Se adicionaron 150  $\mu$ l de solución D y 7.5  $\mu$ l de TEMED (BIO RAD). Finalmente se adicionaron 50  $\mu$ l de la solución E. Se homogeneizó cuidadosamente y se aplicó al aparato de electroforesis. Sobre el gel separador se adicionaron 5 ml (aproximadamente) de 1-butanol (J.T. Baker) y se dejó gelificar por 45 minutos a TA.

El 1-butanol se decantó y se enjuagó el gel 3 veces con 5 ml de  $H_2O_{DD}$ . El gel concentrador se preparó de acuerdo a la siguiente formulación: 800  $\mu$ l de solución A, 3.6 ml de  $H_2O_{DD}$  y 500  $\mu$ l de solución C. Se degasificó la solución como se mencionó anteriormente y se le agregó 50  $\mu$ l de solución D, 5  $\mu$ l de TEMED y 17  $\mu$ l de solución E. Se homogeneizó cuidadosamente y se aplicó sobre el gel separador. Inmediatamente después se colocó el peine (plantilla para carriles) y se dejó gelificar por 45 minutos. Se retiró el peine y se lavó tres veces con 5 ml de  $H_2O_{DD}$ .

La preparación de las muestras y de los marcadores de peso molecular (marcadores de peso molecular bajo y alto, BIO RAD) se hizo de la siguiente manera: se mezclaron 0.1 mg de muestra en 1 ml de solución G, se homogeneizaron perfectamente y se incubaron a 37 °C por 15 minutos. Las muestras se pusieron en agua hirviendo por 5 minutos y se enfriaron a TA. Se centrifugaron 2 minutos a 3500 g y se aplicaron en los carriles de corrimiento del gel concentrador. Los parámetros de corrimiento fueron los siguientes 20 miliampers, 200 volts y 2 watts. El tiempo de corrimiento fué de aproximadamente dos horas.

Al finalizar el corrimiento el gel se retiró del aparato de electroforesis y se depositó en un recipiente que contenía 35 ml de amortiguador de transferencia (metanol 20%, glicina 0.192 M y trizma-base 0.025 en  $H_2O_{DD}$ ).

La transferencia se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin y colaboradores (96). En un cassette de la cámara de transferencia se pusieron en el siguiente orden los elementos: 1) esponja; 2) tres rectángulos de papel filtro Whatman # 3 de 9X10.5 cm; 3) gel de poliacrilamida-SDS; 4) papel de nitrocelulosa (BA85 0.45  $\mu$ m, Schleicher & Schuell) de 9X10.5 cm; 5) tres rectángulos de papel filtro

Whatman # 3 de 9X10.5 y 6) esponja. Todos los elementos se mojaron previamente en amortiguador de transferencia (Metanol al 20%, Glicina 0.192 M y Trisma-base 0.025 M). Se cerró el cassette y se metió en la cámara de transferencia. El papel de nitrocelulosa quedó entre el gel y el electrodo positivo. El amortiguador de transferencia debe estar a 4°C y durante la transferencia debe ser enfriado por un sistema recirculante. Los parámetros de transferencia fueron: 120 volts, 30 miliampers por 75 minutos. Una vez que se completó la transferencia se retiró el papel de nitrocelulosa, se cortó en tiras de aproximadamente 3 mm y se bloqueó por 2 horas con leche descremada (Camallion) al 3.0% en PBS. Los marcadores de peso molecular y una tira se colorearon (sin ser bloqueados) con amido black (2.0 g Amido black, SIGMA, 90 ml de metanol J. T. Baker, 20 ml de ácido acético glacial J. T. Baker y 90 ml de H<sub>2</sub>O) se destiñeron hasta que las bandas estuvieron bien definidas con solución decolorante (90 ml de metanol J. T. Baker, 20 ml de ácido acético glacial J. T. Baker y 90 ml de H<sub>2</sub>O). Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS 0.05% de Tween 20 (BIO RAD) con agitación constante. Posteriormente se aplicaron los sueros por separado a una concentración de 1:5 en PBS/leche al 3%, se incubó por 2 hora a TA con agitación constante. Se lavó tres veces como se mencionó anteriormente y se adjicónó el segundo anticuerpo anti-humano marcado con fosfatasa alcalina (anti-cadenas gama o  $\mu$ , SIGMA) diluido 1:500 en PBS/leche al 3% y se incubó a TA con agitación constante por una hora. Se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween y un lavado de 10 minutos con amortiguador de Tris (Trizma base 0.05M pH 8.8). El sustrato revelador (Naphtol AS-MX phosphato de SIGMA a una concentración de 1 mg/ml y Fast Red SIGMA a una concentración de 2 mg/ml en amortiguador de tris) se preparó durante el último lavado y se aplicó sobre el papel de nitrocelulosa permitiendo que ésta solución cubra bien al papel. Se incubó aproximadamente 30 minutos a TA con agitación constante, hasta que el control positivo mostró una coloración bien definida. Finalmente se lavó con H<sub>2</sub>O.

## 7. RESULTADOS

**7.1 Identificación de los aFTC por ELISA.** Se ensayaron 100 sueros de individuos clínicamente sanos, proporcionados por el banco de donadores del INNSZ. A dichos sueros se les habían practicado previamente las siguientes pruebas de laboratorio: VDRL, positividad al virus de la hepatitis B y ELISA para antígenos de VIH. Todos los sueros fueron negativos para los tres ensayos. La tabla 3 muestra la distribución de los aFTC por isotipo de inmunoglobulina y el porcentaje de positividad encontrado.

Tabla 3. aFTC en una población humana normal

Isotipo de inmunoglobulina	$\bar{X}$ DO <sub>405</sub>	D.E.	Positivos % (n=100)
IgG	0.049	0.027	0
IgM	0.16	0.12	85

El 85% (85/100) de los sueros estudiados a una dilución de 1:5, fueron positivos para aFTC de clase IgM y ninguno de clase IgG. Los 85 sueros positivos para aFTC de clase IgM se inhibieron con micelas de FTC y se encontró que el 93% de ellos (79/85) fueron inhibidos en más del 50% de su actividad. Dado que el volumen de suero es importante por el número de ensayos que se practicó a cada uno, se tomaron 13 sueros de los que tenían mayor volumen para los estudios siguientes.

**7.2 Reconocimientos de EBr.** Para eliminar el reconocimiento de estructuras de la membrana del eritrocito diferentes a los fosfolípidos expuestos con el tratamiento enzimático con bromelina, los sueros se adsorbieron previamente, varias veces, con

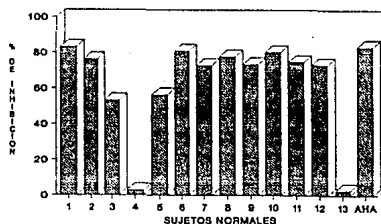
eritrocitos de ratón o de humano sin bromelinizar. Los anticuerpos que reconocen la FTC de la membrana del eritrocito se detectaron por citometría de flujo con un anticuerpo anti-humano (específico contra las cadenas  $\mu$  o  $\gamma$ ) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En un primer ensayo se probaron anticuerpos contra IgG e IgM marcados con FITC, pero al encontrar reconocimiento sólo de IgM los ensayos subsiguientes se hicieron sólo con anti-IgM-FITC. Los resultados mostrados en la tabla 4 se reportan como porcentaje de pegado. La especificidad contra FTC se demostró por ensayos de competencia con micelas de FTC a concentración final de 1 mg/ml. Como se muestra en la tabla 4 el 84.5% (11/13) de los sueros estudiados se inhibieron con las micelas de FTC. La máxima inhibición observada fue del 82% (figura 1). Inhibiciones consecutivas con micelas de FTC no incrementaron el porcentaje de inhibición, en dos de los sueros probados (sueros 1 y 6, datos no mostrados).

Tabla 4. Reconocimiento de EBr y su inhibición con micelas de FTC

Suero	% de pegado*				% inh.
	sin micelas		con micelas		
	Br(+)	Br(-)	Br(+)	Br(-)	
1	11.8	1.5	1.1	0.8	82.9
2	20.4	0.9	2.8	0.8	75.9
3	10.7	0.7	3.3	0.5	53.0
4	3.0	0.4	2.2	0.6	0.15
5	10.3	1.1	2.9	1.2	56.1
6	6.6	0.4	0.7	0.4	80.8
7	10.7	1.0	1.7	1.2	72.0
8	20.6	0.7	2.6	1.4	77.0
9	9.7	0.6	1.5	0.3	72.2
10	11.8	0.8	1.3	1.0	60.1
11	10.3	1.8	1.5	1.3	74.6
12	21.2	1.2	3.3	1.6	73.1
13	6.7	4.0	7.7	3.6	0.07

\*Promedio de dos determinaciones

FIGURA 1  
INHIBICION DEL RECONOCIMIENTO DE EBr  
CON MICELAS DE FTC



La mayoría de los sueros fueron inhibidos entre un 53 y 83%. Los sueros 4 y 13 muestran porcentajes bajos de reconocimiento de los fosfolípidos de la membrana de

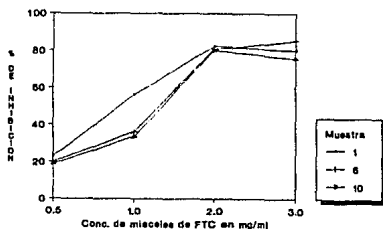
los ERBr, estos dos sueros en cambio si reconocieron a la FTC en fase sólida (ver sección 6.4). De manera contraria, el suero 6 muestra un reconocimiento relativamente bajo (tabla 4), pero que al ser puesto en el ensayo competitivo se inhibió hasta un 81.0%. La inhibición del reconocimiento de ERBr siguió una tendencia dosis-respuesta, dependiente de la concentración de micelas de FTC (figura 2), lo que demuestra que el epítipo expuesto por los ERBr es el mismo que se expone en las micelas de FTC, y que es reconocido por los aFL de clase IgM circulantes de los sujetos sanos.

Tabla 5. Inhibición del reconocimiento de EBr con micelas de FTC (Curva dosis respuesta).

Muestra	Conc. de micelas	% inh.*
7	3.0 mg/ml	80.1
	2.0 *	82.3
	1.0 *	56.1
	0.5 *	23.1
6	3.0 mg/ml	85.4
	2.0 *	80.8
	1.0 *	36.1
	0.5 *	20.0
10	3.0 mg/ml	75.6
	2.0 *	80.1
	1.0 *	33.7
	0.5 *	18.9

\*Promedio de tres determinaciones

FIGURA 2  
INHIBICIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE ERBr  
CURVA DOSIS-RESPUESTA



Los trece sueros seleccionados por su positividad contra FTC, se probaron también contra los siguientes antígenos: DNACs, DNACd, GGA, vimentina y proteínas del citoesqueleto en dos líneas celulares, una de carcinoma de laringe humano la HEP-2 y una cepa de fibroblastos humanos sanos. Los sueros se probaron a dilución de 1:5 y se hicieron ensayos de competencia para probar su especificidad.

**7.3 Actividad anti-DNACs.** El DNA nativo a concentración de 10  $\mu$ g/ml se desnaturalizó a 100 °C por 10 minutos y se mezcló V/V con los sueros diluidos 1:5 en

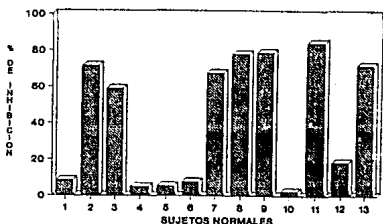
PBS/SBF 10%, se incubó como se menciona en la sección de materiales y métodos para favorecer la formación de complejos Ag-Ac y se realizó el ensayo de ELISA para DNAs. Como se muestra en la tabla 6, 7 de los 13 sueros (54%) mostraron inhibiciones mayores al 50% (figura 3).

Tabla 6 Reconocimiento del DNAs en la fase sólida e inhibición de éste con DNAs en la fase líquida

Muestra	IgM DO <sub>50</sub> *		% de inh
	sin inhibir	inhibido	
1	0.097	0.089	8.2
2	0.125	0.0355	71.6
3	0.112	0.046	58.0
4	0.067	0.060	4.8
5	0.077	0.073	5.2
6	0.053	0.049	7.5
7	0.105	0.024	87.6
8	0.123	0.027	78.0
9	0.086	0.018	79.0
10	0.045	0.048	2.2
11	0.205	0.032	84.4
12	0.08	0.049	38.3
13	0.082	0.026	71.7

\*Promedio de tres determinaciones

FIGURA 3  
INHIBICION DEL RECONOCIMIENTO DE DNAs  
CON DNAs EN LA FASE LIQUIDA



Los SHN estudiados a bajas diluciones, reconocieron DNAs. El que los anticuerpos reconozcan esta estructura y no se trate de un artefacto del ensayo se demostró por las inhibiciones con DNAs en la fase líquida. Como se puede ver, los sueros con D.O. menores a 0.08 tienen inhibiciones que no rebasan el 20%. La cantidad tan pequeña de anticuerpo con esta especificidad está fuera de la sensibilidad del ensayo por lo que es prácticamente imposible demostrar su inhibición y por tanto demostrar su presencia en los sueros ensayados. Estos mismos anticuerpos que reconocen DNAs muestran reactividad cruzada con FTC en micelas (figura 4, tabla 7). Como se puede ver, los mismos sueros que mostraron reconocimiento por DNAs y que se inhibieron con

DNACs en la fase líquida son los que se inhibieron con micelas de FTC (Figura 5).

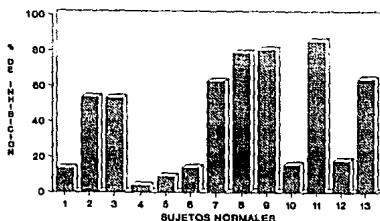
Tomando en cuenta la observación antes mencionada de que los sueros con canti-

Tabla 7. Reconocimiento del DNACs en fase sólida e inhibición de éste con micelas de FTC

IgM DO <sub>12</sub> *			
Muestra	an inhibir	inhibido	% de inh
1	0.100	0.087	13.0
2	0.143	0.057	53.2
3	0.120	0.053	57.8
4	0.085	0.052	3.5
5	0.09	0.083	8.6
6	0.040	0.042	15.6
7	0.15	0.054	62.4
8	0.103	0.035	78.3
9	0.07	0.014	80.1
10	0.074	0.053	15.3
11	0.186	0.029	85.0
12	0.085	0.054	17.6
13	0.113	0.041	65.6

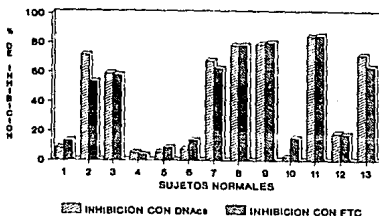
\*Promedio de tres determinaciones

FIGURA 4  
INHIBICION DEL RECONOCIMIENTO DE DNACs  
CON MICELAS DE FTC



dades muy pequeñas de anticuerpo que reconoce DNACs escapan a la sensibilidad del método, podemos considerar que otros sueros pudieran tener reactividad contra DNACs y que dichos anticuerpos (como se demostró en el 54 % de los sueros ensayados) tengan también reactividad cruzada contra FTC.

Figura 5  
REACTIVIDAD CRUZADA DNACs-FTC  
FTC EN LA FASE SOLIDA



La figura 5 muestra claramente la reactividad cruzada de los anticuerpos estudiados, ya que al inhibir con DNACs se observa la misma caída de las D.O. que al inhibir con

micelas de FTC. Obsérvese la relación tanto en los sueros 2, 3, 7, 8, 9, 11 y 13 que se inhiben con ambos antígenos como en aquéllos en donde no existe el anticuerpo o lo hay en concentraciones muy bajas.

**7.4 Actividad anti-DNAcd.** Los sueros seleccionados fueron probados para actividad anti-DNAcd por ELISA, encontrándose un importante reconocimiento por lo que fué necesario demostrar la especificidad de los sueros hacia la molécula de DNAcd. Para tal efecto se hicieron curvas dosis-respuesta con concentraciones de DNAcd de 1000  $\mu\text{g/ml}$  a 15.6  $\mu\text{g/ml}$  y con dilución constante de los sueros (1:5). En la figura 6 se muestran las curvas dosis-respuesta de ocho de los sueros ensayados.

Tabla 8. Inhibición de la actividad anti-DNAcd con DNAcd en la fase líquida (curva dosis-respuesta)

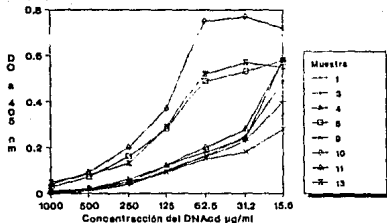
Muestra	IgM DG <sub>24</sub> *						
	Concentración de DNAcd en $\mu\text{g/ml}$						
	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.6
1	0.0	0.01	0.04	0.095	0.163	0.25	0.049
2	0.0	0.0	0.02	0.06	0.09	0.12	0.22
3	0.01	0.015	0.04	0.1	0.16	0.23	0.40
4	0.0	0.02	0.06	0.12	0.18	0.24	0.58
5	0.03	0.07	0.16	0.26	0.49	0.53	0.58
6	0.0	0.0	0.01	0.03	0.05	0.09	0.15
7	0.0	0.0	0.04	0.12	0.17	0.2	0.2
8	0.001	0.0	0.015	0.04	0.1	0.06	0.1
9	0.01	0.02	0.05	0.09	0.15	0.16	0.29
10	0.04	0.09	0.2	0.37	0.75	0.77	0.72
11	0.01	0.02	0.05	0.12	0.2	0.26	0.56
12	0.002	0.01	0.015	0.04	0.07	0.13	0.24
13	0.05	0.08	0.13	0.028	0.05	0.1	0.08

\*Promedio de tres determinaciones

A medida que la concentración de DNAcd en el medio disminuye, la cantidad de anticuerpo libre contra DNAcd es mayor y por tanto hay más reconocimiento del DNAcd de la fase sólida. Una vez demostrada la actividad anti-DNAcd de los sueros por curvas de inhibición se procedió a investigar el efecto que tiene la inhibición con DNAcd sobre la actividad anti-FTC.



FIGURA 6  
INHIBICION DEL RECONOCIMIENTO DE DNAcD  
CURVA DOSIS-RESPUESTA



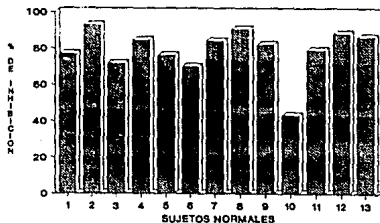
Mediante el ELISA de FTC se probó la actividad de los sueros previamente inhibidos con DNAcD en la fase líquida y se encontró que el 100 % de los sueros (13/13) fueron inhibidos con DNAcD en su actividad aFTC. La figura 7 muestra estos resultados.

FIGURA 7  
INHIBICION DEL RECONOCIMIENTO DE FTC  
CON DNAcD EN LA FASE LIQUIDA

Tabla 8 Inhibición de la actividad aFTC con DNAcD en la fase líquida

Muestra	IgM DO <sub>450</sub> *		% de inh
	sin inhibir	Inhibido	
1	0.177	0.0415	76.6
2	0.260	0.0215	92.0
3	0.2375	0.009	71.4
4	0.2115	0.001	94.1
5	0.1575	0.038	75.9
6	0.140	0.045	69.5
7	0.08	0.016	83.7
8	0.155	0.015	90.3
9	0.275	0.05	81.8
10	0.35	0.2	42.8
11	0.225	0.05	78.7
12	0.125	0.015	88.0
13	0.003	0.015	84.0

\*Promedio de tres determinaciones



Los sueros inhibidos con DNAcD fueron probados también por ELISA para actividad de FR con la finalidad de detectar reactividad cruzada. Los porcentajes de inhibición

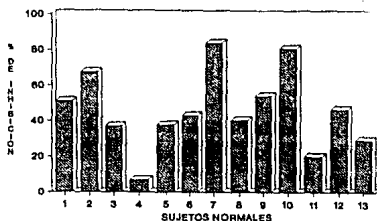
de los sueros estudiados se muestran en la tabla 10 y en la figura 8. El 84% de los sueros se inhibieron por arriba del 20%, los sueros 4 y 11 muestran las inhibiciones menores. En los ensayos de inhibición con DNACd se observa que existe reactividad cruzada contra GGA por los anticuerpos detectados a diluciones bajas en los sueros de los sujetos sanos.

Tabla 10. Inhibición de la actividad de FR por DNACd en la fase líquida

Muestra	IgM DO <sub>50</sub> *		% de inh
	sin inhibir	inhibido	
1	0.255	0.13	50.9
2	0.20	0.085	67.3
3	0.3475	0.215	37.0
4	0.425	0.390	6.8
5	0.0815	0.425	37.8
6	0.0615	0.035	43.0
7	0.385	0.062	83.9
8	0.275	0.154	40.4
9	0.2125	0.075	54.1
10	0.085	0.132	80.7
11	0.245	0.190	20.0
12	0.1775	0.0917	48.5
13	0.19	0.1345	29.2

\*Promedio de tres determinaciones

FIGURA 8  
INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FR  
CON DNACd EN LA FASE LÍQUIDA



**7.5 Actividad de factor reumatoide.** Al probar los sueros a bajas diluciones contra IgG por ELISA se encontró como se muestra en la tabla 11 (figura 9), un importante reconocimiento de esta molécula en la fase sólida por anticuerpos de clase IgM y no hubo reconocimiento por anticuerpos de clase IgG. Al ser inhibidos los anticuerpos de clase IgM con gama globulina agregada (GGA) en suspensión se observaron inhibiciones hasta del 66%. El 77% de los sueros se inhibe con GGA por arriba del 20%. Los sueros 11 y 13 son nuevamente los que muestran las D.O. más bajas. El suero número 3 a pesar de tener D.O. relativamente altas en el ensayo de ELISA muestra un porcentaje de inhibición bajo, que puede estar dado por diferencias en el

epítoto reconocido en la molécula del inhibidor en la fase líquida y el epítoto que se expone en la placa de ELISA (fase sólida).

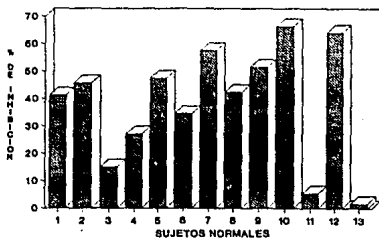
Los sueros inhibidos con GGA fueron además ensayados por ELISA para aFTC con la finalidad de ver cómo se ve afectada dicha actividad por la presencia de la molécula

Tabla 11. Actividad de factor reumatoide e inhibición de esta actividad.

Muestra	IgM DO <sub>50</sub> *		% de inh
	sin inhib	inhibido	
1	0.021	0.541	41.2
2	0.043	0.4805	45.6
3	0.424	0.3805	15.0
4	0.374	0.2725	27.1
5	0.726	0.389	47.3
6	0.895	0.5575	34.4
7	0.5095	0.255	57.5
8	0.237	0.137	42.2
9	0.743	0.3908	51.4
10	0.835	0.2816	66.3
11	0.419	0.305	5.3
12	0.843	0.2312	64.1
13	0.425	0.429	1.6

\*Promedio de tres determinaciones

FIGURA 9  
INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE FR



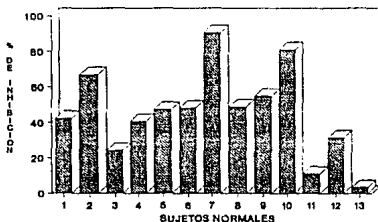
de IgG agregada en suspensión. Como se puede ver en la figura 10 (tabla 12) el 85% (11/13) de los sueros se inhibieron por arriba del 20% de su actividad. Una vez más los sueros 11 y 13 mostraron los porcentajes de inhibición menores. El efecto descrito anteriormente en el suero número tres se repite, es decir, se observaron D.O. altas pero porcentaje de inhibición bajo que como ya se mencionó se puede deber a diferencias en el epítoto de reconocimiento de la molécula inhibitoria que en éste caso es GGA y la molécula empleada para la detección (FTC).

Tabla 12. Actividad de aFTC e inhibición de ésta con GGA en la fase líquida.

Muestra	IgM DO <sub>50</sub> *		% de inh
	sin Inhibir	Inhibido	
1	0.282	0.163	42.2
2	0.2505	0.096	60.8
3	0.346	0.203	24.0
4	0.413	0.246	40.4
5	0.7075	0.418	47.2
6	0.057	0.02	48.0
7	0.42	0.0406	90.3
8	0.257	0.132	48.6
9	0.1935	0.0975	54.8
10	0.642	0.123	80.8
11	0.238	0.212	10.9
12	0.1745	0.0915	31.2
13	0.1885	0.182	3.4

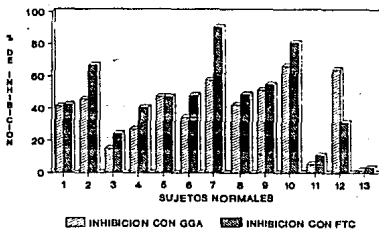
\*Promedio de tres determinaciones

FIGURA 10  
INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE aFTC  
CON GGA EN LA FASE LIQUIDA



La figura 11 muestra la inhibición de los anticuerpos con actividad de FR (anti-IgG) por dos antígenos FTC (en micelas) y GGA.

Figura 11  
REACTIVIDAD CRUZADA GGA-FTC



Como se puede ver el patrón de inhibición es prácticamente el mismo, hecho que constituye una evidencia indirecta de la reactividad cruzada de los aFTC con los anticuerpos con actividad de FR o viceversa, y que está dada posiblemente por un mismo anticuerpo con polirreactividad.

**7.6 Ensayo hemolítico.** El ensayo hemolítico se realizó con eritrocitos de ratón tratados con bromelina, incubados con la dilución de los SHN como se describe en materiales y métodos. La tabla 13 muestra la hemólisis observada como resultado de la activación de la cascada del complemento por la vía clásica en la que el anticuerpo específico es un aFL (del SHN) y la fuente del complemento la proporciona el suero de conejo. La hemólisis inespecífica se obtiene por tratamiento de los ERBr con la fuente de complemento (Blanco). El 100 % de hemólisis se obtuvo resuspendiendo el paquete celular con agua (hemólisis total). La hemólisis se expresa en porcentaje y se calculó de acuerdo a la fórmula descrita en materiales y métodos.

Tabla 13. Porcentaje de hemólisis dada por los aFTC de los SHN.

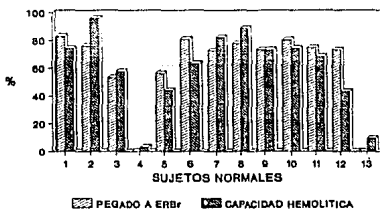
Muestra	DO <sub>540</sub> *			% de hemólisis
	Blanco	Hemólisis total	Hemólisis por el aFTC	
1	0.097	1.702	1.326	74.0
2	0.053	1.915	1.890	98.0
3	0.092	1.810	1.108	57.7
4	0.057	1.707	0.110	3.1
5	0.0535	1.815	0.945	44.0
6	0.059	1.757	1.164	63.1
7	0.07	1.783	1.525	82.0
8	0.062	1.965	1.432	88.8
9	0.054	1.815	1.379	73.0
10	0.083	1.834	1.425	74.3
11	0.085	1.737	1.262	68.1
12	0.053	1.796	0.823	43.0
13	0.057	1.810	0.228	9.4

\* Promedio de tres determinaciones

El 84% de los sueros (11/13) muestra claramente hemólisis debida a los anticuerpos contra ERBr, 72% de los cuales tienen porcentaje de ésta por arriba del 60%. Sólo dos de los 13 sueros no mostraron actividad hemolítica. Al comparar los porcentajes de hemólisis con el reconocimiento de los ERBr (Figura 12), se observa que hay

concordancia entre estos, lo que apoya la noción de que la hemólisis es causada por estos autoanticuerpos.

Figura 12  
RECONOCIMIENTO DE ERBr Y CAPACIDAD  
HEMOLITICA DE LOS aFTC



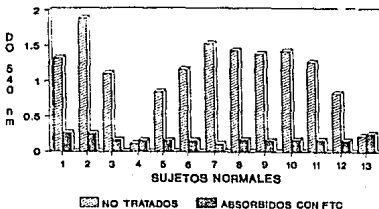
Esto se confirma al inhibir los sueros con micelas de FTC, como se puede ver en la figura 13 (tabla 14) la capacidad hemolítica de los sueros se abate casi en su totalidad.

Tabla 14. Inhibición de la hemólisis con micelas de FTC

Muestra	DC <sub>50</sub> *	
	PBS	Micelas de FTC (+)
1	1.328	0.267
2	1.890	0.253
3	1.106	0.182
4	0.110	0.157
5	0.845	0.153
6	1.164	0.156
7	1.525	0.107
8	1.432	0.162
9	1.379	0.154
10	1.425	0.163
11	1.262	0.165
12	0.823	0.153
13	0.228	0.257

\*Promedio de tres determinaciones

Figura 13  
HEMOLISIS DE ERBr POR aFTC-IgM  
EN PRESENCIA DE C'



Con el ensayo de inhibición de la hemólisis queda demostrado que la capacidad hemolítica de los sueros está dada por los anticuerpos que reconocen al EBr, cuyo epítipo expuesto es la FTC.

Para determinar el epítipo que reconocen los anticuerpos contra ERBr se hicieron ensayos de competencia con FTC y fragmentos de ésta molécula. Los resultados se describen en el apartado siguiente.

**7.7 Epítipos reconocidos por los aFTC.** Para determinar el epítipo que reconocen los anticuerpos contra FTC detectados en los sujetos normales se hicieron ensayos de competencia con las siguientes moléculas: FTC, ácido fosfatídico (AF), fosforilcolina (Fric), acetilcolina (ACo), y trimetilamonio (TMA) (Figura 14).

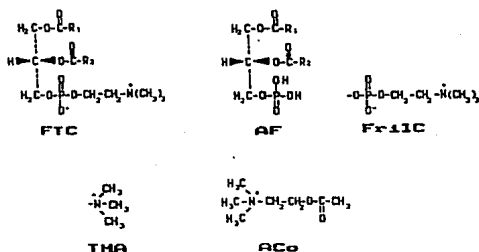


Figura 14. Representación esquemática de la molécula de fosfatidilcolina y de las porciones de ésta utilizadas para determinar el epítipo reconocido por los aFTC. FTC = Fosfatidilcolina; AF = Acido fosfatídico; Fric = Fosforilcolina; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> = Cadenas de ácidos grasos; TMA = Trimetilamonio; y ACo = Acetilcolina.

Inhibiciones mayores al 40% se consideraron como verdaderas en función de lo siguiente:

a) Concentraciones relativamente altas del inhibidor (1 mg/ml) no dan inhibiciones del 100%.

b) Inhibiciones consecutivas de los sueros con el mismo inhibidor no eliminan en su totalidad el reconocimiento de FTC en la fase sólida.

c) Inhibiciones superiores al 30% dan, en ensayos de inhibición dosis-respuesta, curvas bien definidas que muestran reconocimiento específico.

De lo anterior se concluye que, inhibiciones entre el 0 y el 20% pueden ser inespecíficas.

En la tabla 15 se muestran los porcentajes de inhibición del reconocimiento de FTC en la fase sólida con las diferentes moléculas en fase líquida.

Tabla 15. Epítopes reconocidos por los aFTC de sujetos normales.

Muestra	% de inhibición				
	FTC*	AF*	FritC*	TMA**	ACo**
1	82.1	63.1	80.6	27.0	15.0
2	80.5	48.2	75.4	25.2	-1.0
3	79.4	54.5	82.5	18.4	-4.0
4	87.2	10.6	85.4	20.3	-5.0
5	80.0	68.3	79.5	15.8	13.0
6	88.4	45.1	85.4	31.0	3.0
7	82.1	72.1	83.2	28.0	14.0
8	80.9	54.9	77.8	15.3	7.0
9	87.5	62.8	86.4	24.1	13.0
10	80.0	48.2	81.6	15.2	4.3
11	85.2	70.5	75.1	23.7	10.4
12	83.7	54.8	82.6	18.6	-7.7
13	81.4	12.4	76.5	24.5	6.3

\* Promedio de dos determinaciones.

\*\* Promedio de tres determinaciones.

En este experimento como en los previos la inhibición del reconocimiento de FTC en la fase sólida con micelas de FTC fué en todos los sueros ensayados (13/13) del



80%. Al inhibir con la fracción de la molécula que no posee al grupo colina (ácido fosfatídico) el reconocimiento disminuyó importantemente. En dos de los sueros (4 y 13) las inhibiciones están en niveles de inespecificidad, lo que sugiere que no hubo inhibición alguna con ésta molécula. Los anticuerpos de los sueros 7 y 11 alcanzaron inhibiciones por arriba del 70.0%, es decir, presentan un patrón de reconocimiento muy similar al de la FTC con el AF. Los sueros restantes (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10 y 12) muestran inhibiciones del 50% con la molécula de AF hecho que manifiesta la importancia de esta porción en el reconocimiento de los anticuerpos contra FTC. Al ensayar la cabeza polar (fosforilcolina) de la FTC, se obtienen reconocimientos prácticamente iguales a los de la molécula de FTC completa. Lo que nos lleva a pensar que dicho epítoto juega un papel cardinal en el reconocimiento de la FTC por los anticuerpos encontrados en los sujetos sanos. La pérdida del fosfato elimina completamente el reconocimiento de la cabeza polar como se puede ver al realizar ensayos de competencia con acetilcolina. Este ensayo nos muestra la importancia del grupo fosfato en el reconocimiento de la molécula de FTC. Por último tenemos los ensayos de inhibición con la porción más distante de la cabeza polar de la FTC, el grupo trimetilamonio. Las inhibiciones están en niveles que determinamos de antemano como inespecifica. Sin embargo, no son tan bajas como las observadas con ACo, en las que la absorción no altera el reconocimiento de la molécula de FTC en la fase sólida, lo que podría significar un reconocimiento muy bajo de la porción TMA por ser una molécula muy pequeña a pesar de que se encuentra unida a albúmina para llevar a cabo el ensayo. En los ensayos de competencia para detectar el reconocimiento de

las moléculas de FTC, AF y FrilC, se monitorizaron los reconocimientos con curvas dosis respuesta de un control positivo conocido. El control es el suero de un paciente con anemia hemolítica autoinmune descrito por Cabral y colaboradores (11). Para el caso del TMA, dicho control mostró inhibiciones no mayores del 40%.

Por los resultados de las inhibiciones de los trece sueros y dado que no se cuenta con un control positivo fuerte, los resultados de reconocimiento del TMA deben ser tomados con cautela.

**7.8 Detección de anticuerpos antinucleares (AAN) y anticitoplásmicos (AAC) por inmunofluorescencia indirecta (IFI).** El ensayo de inmunofluorescencia se realizó como se describe en materiales y métodos, utilizando dos fuentes de antígenos la línea celular de carcinoma de laringe humano HEp-2 y una cepa celular de fibroblastos humanos sanos. Con dichos sustratos se investigó en los sueros la presencia de patrones de tinción tanto del núcleo como del citoplasma. Como controles de patrones nucleares se utilizaron el suero de un paciente con lupus eritematoso generalizado (LEG) y el de un paciente con enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), y como control de AAC se utilizó el suero de un paciente con cirrosis biliar primaria y el suero de un paciente con LEG que mostró un patrón citoplásmico homogéneo por IFI. Los controles se diluyeron 1:160 y los SHN 1:5 inicialmente para poder comparar los patrones. En la tabla 16 se describen los patrones observados.

Patrones de reconocimiento nuclear se observaron exclusivamente con los anticuerpos de clase IgG de los sujetos normales, en tanto que, no hubo

reconocimiento de los componentes nucleares por anticuerpos de clase IgM, sin embargo, el reconocimiento de estructuras citoplásmicas se observa tanto con anticuerpos de clase IgG como de clase IgM.

Tabla 16. Patrones de AAN y AAC encontrados en los sujetos sanos

Muestra	IgG		IgM	
	AAN	AAC	AAN	AAC
1	MG + 1:5	Cr + 1:5	Neg	FI ++ 1:10
2	Neg	Cr + 1:5	Neg	Cr + 1:10
3	MG + 1:5	Cr + 1:5	Neg	FI +++ 1:20
4	MG + 1:5	Cr + 1:5	Neg	Cr + 1:5
5	MG + 1:5	Cr + 1:5	Neg	FI ++ 1:10
6	Neg	Cr + 1:5	Neg	FI +++ 1:20
7	Neg	Neg	Neg	FI +++ 1:20
8	MG + 1:5	Neg	Neg	FI ++ 1:20
9	Neg	Neg	Neg	FI ++ 1:10
10	MG + 1:5	Cr + 1:5	Neg	FI +++ 1:20
11	Neg	Neg	Neg	FI +++ 1:20
12	Neg	Neg	Neg	FI +++ 1:20
13	MG + 1:5	Cr + 1:5	Neg	Cr + 1:5

MG = Moteado grueso  
 Cr = Citoplásmico  
 FI = Filamentos intermedios

Un fenómeno muy peculiar es el observado en los patrones citoplásmicos, para los anticuerpos de clase IgG el patrón de reconocimiento es citoplásmico homogéneamente distribuido, mientras que el patrón citoplásmico que muestran los anticuerpos de clase IgM de los sueros estudiados es en el 77% (10/13) de filamentos intermedios (figura 15) y en el 23% restante es también citoplásmico pero con distribución homogénea.

Las preguntas siguientes a responder son: ¿tienen los AAC reactividad cruzada contra FTC? o bien ¿son los mismos anticuerpos, los detectados con FTC que los que se observan por IFI?

Para contestar las preguntas se utilizaron las siguientes estrategias:

1) Inhibición de los sueros con FTC y posterior ensayo por IFI.

2) Inhibición de los sueros con vimentina (proteína mayoritaria de los filamentos intermedios) y ensayos de ELISA para aFTC.

En el ensayo de inhibición con FTC fueron necesarias dos inhibiciones con concentraciones de 1 mg/ml de micelas del fosfolípido para eliminar por completo los patrones de filamentos intermedios y citoplásmico homogéneo que dan los anticuerpos de clase IgM.

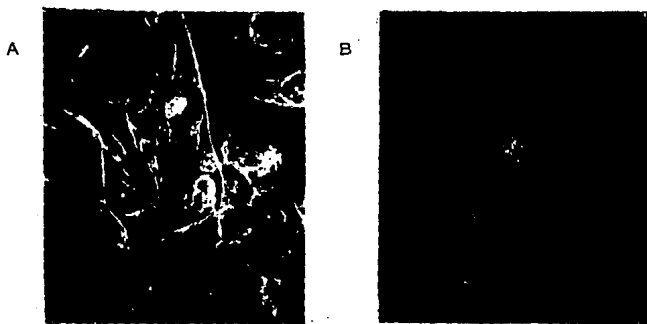


Figura 15. La fotografía muestra el patrón citoplásmico de filamentos intermedios del suero número 1 en los dos sustratos A. HEp-2 y B. Fibroblastos humanos sanos.

Los trece sueros inhibidos con micelas de FTC perdieron totalmente el reconocimiento de las estructuras del citoplasma por los anticuerpos de clase IgM. Los anticuerpos de clase IgG no se vieron modificados ni en el reconocimiento de estructuras citoplásmicas ni en el de estructuras nucleares, lo que sugiere que no existe reactividad cruzada de estos anticuerpos con otros antígenos, o bien, que el epitope

que se expone en las micelas de FTC no es reconocido en forma cruzada por los anticuerpos de clase IgG que se unen a componentes nucleares y citoplásmicos, en tanto que, los anticuerpos de clase IgM contra estructuras citoplásmicos manifiestan su polirreactividad al ser inhibidos por las micelas de FTC.

La demostración del reconocimiento cruzado de los AAC de clase IgM con FTC detectados en el suero de sujetos sanos se presenta en el apartado siguiente.

### **7.9 Determinación de la reactividad cruzada de los aFTC con vimentina.**

Mediante la técnica de inmunopunto (Dot Blot) se pudo demostrar la presencia de anticuerpos contra vimentina con una alta sensibilidad y especificidad utilizando concentraciones de antígeno bajas (5-10  $\mu$ g). La figura 16 muestra el reconocimiento de la vimentina por los anticuerpos de los sueros estudiados.

Como se puede ver todos los sujetos estudiados mostraron reconocimiento por la proteína, el reconocimiento específico se demostró por ensayos de inhibición con FTC, GGA, DNACd, DNACs y vimentina. La inhibición con cada uno de los antígenos se muestra en la tabla 17 y se expresa como inhibición (+) o ausencia de ésta (Neg).

Existe una importante reactividad cruzada de los aFTC con los antígenos probados, hecho que se demuestra con los ensayos de inhibición (tabla 17).

Todos los sueros fueron inhibidos por cuando menos tres de los antígenos lo que manifiesta una importante polirreactividad con estructuras conservadas filogenéticamente.

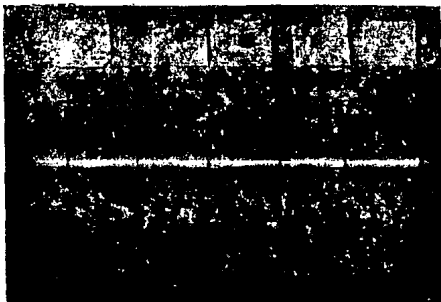


Figura 16. En la fotografía se muestran los resultados de la técnica de inmunopunto para la detección de anticuerpos contra vimentina en los sueros estudiados. SHN= Suero humano normal.

Un fenómeno que salta a la vista al observar detenidamente los datos de la tabla 17 es el hecho de que más del 90.0% de los sueros reconocen en forma cruzada las estructuras que poseen el grupo fosfato como constituyente de la molécula, lo cual corrobora los hallazgos presentados con respecto al epítipo de reconocimiento de los anticuerpos que fueron originalmente detectados por el ensayo de ELISA para aFTC.

Tabla 17. Inhibición del reconocimiento a vimentina de los anticuerpos de clase IgM por diferentes antígenos (Inmunopunto).

Muestra	Inhibidor				
	FTC	GGA	DNAc	DNAs	Vimentina
1	+	Neg	+	Neg	+
2	+	+	+	+	+
3	+	Neg	+	+	+
4	+	Neg	+	Neg	+
5	+	+	+	Neg	+
6	+	+	+	Neg	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	Neg	Neg	+
11	+	Neg	+	+	+
12	+	Neg	+	Neg	+
13	+	Neg	+	+	-

+ = Se inhibió  
Neg = No se inhibió

**7.10 Electroinmunotransferencia (Western blot).** Mediante ésta técnica se pudo corroborar el reconocimiento de la proteína del citoesqueleto, vimentina, que se detectó por IFI e inmunopunto. Como se puede ver en la figura 17 la banda de reconocimiento de la vimentina purificada (SIGMA) sólo es reconocida por los anticuerpos de clase IgM, no siendo así con los de clase IgG presentes en los SHN estudiados.



**Figura 17.** A. Marcadores de peso molecular alto preteñidos (BIO-RAD); B. vimentina (SIGMA teñida con amido black); C. 4 SHN, isotipo IgG; D. 4 SHN isotipo IgM; y E. Anticuerpo monoclonal ANTI-VIMENTINA (clona V-9 SIGMA).

Todos los sueros fueron positivos contra vimentina como lo muestra también el ensayo de electroinmunotransferencia. Se corroboró que sólo anticuerpos de clase IgM reconocen vimentina. En la tabla 18 se muestran las inhibiciones con FTC, GGA, DNACd, DNACs y con vimentina del reconocimiento de la banda de vimentina, en los trece sueros ensayados.

Como se puede ver los trece sueros ensayados son inhibidos por cuando menos tres de las moléculas probadas con lo que se demuestra, una vez más, la polirreactividad de los anticuerpos que originalmente se identificaron con FTC en los sujetos sanos.

**Tabla 18.** Determinación de la polirreactividad de los aFTC de los sujetos sanos por inhibición de la electroinmunotransferencia (Western blot).

Muestra	Inhibidor				
	FTC	GGA	DNACd	DNAs	Vimentina
1	+	Neg	+	Neg	+
2	+	+	+	+	+
3	+	Neg	+	+	+
4	+	Neg	+	Neg	+
5	+	+	+	Neg	+
6	+	+	+	Neg	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	Neg	Neg	+
11	+	Neg	+	+	+
12	+	Neg	+	Neg	+
13	+	Neg	+	+	+

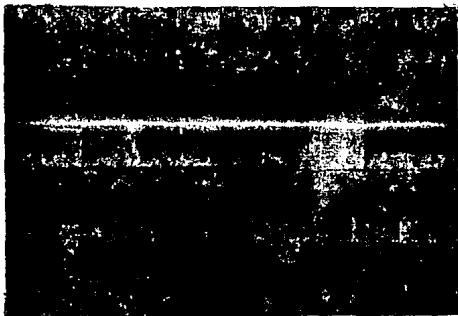
+ = Se inhibió  
Neg = No se inhibió

Aun cuando la sensibilidad se aumentó con la aplicación de ésta técnica (western blot) para la determinación de los anticuerpos, la reactividad contra las diferentes moléculas fue la misma.

La figura 18 nos muestra la evidencia directa del reconocimiento de los anticuerpos contra FTC. Los sueros diluidos 1:5 en SBF/PBS se inhibieron con micelas de FTC y se incubaron como se menciona en materiales y métodos. Una vez formados los complejos Ag-Ac que en este caso son micelas de FTC-Ac, se centrifugaron y lavaron con amortiguador de fosfatos pH neutro. Posteriormente se incubaron con un amortiguador hipermolal de glicina a pH bajo y el sobrenadante se ensayó por la técnica de inmuno punto.

En esta figura se observan los eluidos de las micelas de FTC, como se puede ver la proteína eluida de las micelas es inmunoglobulina de clase IgM.





**Figura 18.** Isotipo de los anticuerpos eluidos de las micelas de FTC. Estos anticuerpos IgM mostraron reactividad contra FTC por ELISA. Los controles (+) son inmunoglobulinas humanas purificadas (SIGMA).

Ningún eluido contenía IgG-aFTC. Esta es, como mencioné anteriormente, la evidencia directa de que existen anticuerpos de clase IgM que reconocen FTC en sujetos normales.

## 8. DISCUSION

En este trabajo se descubren anticuerpos humanos de clase IgM que reconocen FTC en el 85% de los sueros de sujetos sanos. El tamaño de la población y la frecuencia de los aFTC observada nos hace suponer que el hallazgo no es un fenómeno fortuito, sino que la presencia de los aFTC deben tener una participación importante dentro del sistema inmunológico en la defensa contra ataques por gérmenes patógenos, o bien, en la eliminación de sustancias de desecho o dañinas para el organismo.

La demostración del reconocimiento específico de la molécula de FTC por dos ensayos, uno el de inhibición con micelas de FTC y otro por reconocimiento de ERBr nos descarta la posibilidad de reconocimiento o unión inespecífica. Al realizar inhibiciones sucesivas no se obtuvo el 100% de inhibición, esto se debe posiblemente a que existen otros anticuerpos de clase IgM contra EBr diferentes a los aFTC, o bien, podemos estar trabajando en el límite del ensayo. La elución sólo de inmunoglobulina M de las micelas de FTC con las que se inhibió el reconocimiento de los ERBr y de la FTC en la fase sólida (placa de ELISA), confirma la existencia de aFTC a títulos bajos en el suero de sujetos sanos.

Teniendo como antecedente que en los ratones normales existe una cantidad importante de anticuerpos hemolíticos que reconocen eritrocitos de ratón tratados con bromelina, el descubrimiento de éstos mismos anticuerpos en el suero de sujetos sanos era de esperarse. Es importante, sin embargo, considerar el hecho de que los

anticuerpos se encuentran en el plasma como una "probable" mezcla de anticuerpos, y que los individuos no estuvieron libres de gérmenes por lo que los resultados, aunque contundentes, son indirectos pues no podemos descartar que su presencia sea el resultado del encuentro con un antígeno común. Sin embargo, las evidencias obtenidas apoyan fuertemente la noción de que los anticuerpos estudiados pertenecen a la familia de los autoanticuerpos naturales.

La demostración de la capacidad hemolítica de estos anticuerpos que en algunos casos fue casi del 100%, nos sugiere que estos aFTC del humano son la contraparte de los anticuerpos contra ERBr encontrados en los ratones normales. Estos anticuerpos se han reportado también en otras especies como son ratas y conejos, lo que sugiere que son anticuerpos con especificidad conservada filogenéticamente. Aunado a esto, la participación de genes de línea germinal que codifican para los anticuerpos de ratón contra ERBr y que sufren muy poca o ninguna hipermutación somática, sugiere que estos anticuerpos tienen gran importancia en la respuesta inmunológica.

Como sabemos, la mayoría de las células B de los ratones son células de vida corta, estas células se renuevan constantemente en la médula ósea a partir de las células tronco que no expresan inmunoglobulinas de superficie. Estas células de vida media corta se les conoce como células B clásicas para distinguirlas de un subgrupo pequeño de células B denominadas células B-Ly1<sup>+</sup>. Las células B Ly1<sup>+</sup> aparecen muy temprano durante la ontogenia y se propagan a lo largo de la vida de los ratones. Este grupo de células, poseen en su superficie IgM, como muchas de las células B pero además, presentan un marcador distintivo, el antígeno Ly1 que en el humano es la

proteína conocida como CD5. Este subgrupo de células B representa solamente el 1% de las células B de bazo pero constituyen más del 50% de las células B de la cavidad peritoneal.

Estudios realizados por Förster y Hayakawa mostraron que estas células tienen la capacidad de autorreplicarse y repoblar compartimentos propios de las células B Ly1<sup>+</sup>, en ratones receptores depletados de células B. Se sabe además que una cantidad importante de los anticuerpos naturales séricos en particular del isotipo IgM son producidos por estas células. Las células B Ly1<sup>+</sup> son responsables también de la producción de una amplia variedad de autoanticuerpos. Los anticuerpos producidos por este grupo de células tienen muy limitada su capacidad de reconocimiento de haptenos y antígenos protéicos, sin embargo, responden a ciertos antígenos bacterianos tales como  $\alpha$ -1,3 dextran (Dex) y fosforilcolina (FrlC) por lo que su participación en la respuesta inmunológica contra infecciones puede ser muy importante.

La generación de las células B Ly-1<sup>+</sup> tempranamente en la ontogenia, su capacidad de autopropagación y el patrón particular de especificidades expresado permite especular que en ésta población (posiblemente con alguna participación de subgrupos de células B clásicas) su repertorio de regiones V se selecciona tempranamente durante la ontogenia debido al establecimiento de una red de interacciones autoestimuladoras dentro de la población celular. Dichas interacciones podrían predisponer al animal para dar una respuesta de anticuerpos eficiente contra Dex y FrlC en el momento en que se requiera. Además, las células B Ly-1<sup>+</sup> pueden ejercer

una influencia sobre la respuesta inmune dada por la población de células B convencionales.

Extrapolando todos estos conocimientos a los humanos, los aFTC que muestran reactividad cruzada con otros antígenos como son DNACd, DNACs, vimentina y GGA pueden ser promovidos por autoestimulaciones de las células B CD5<sup>+</sup> que dan como resultado una poza de anticuerpos naturales de los cuales el sistema inmune puede echar mano durante un proceso infeccioso. La polirreactividad de estos anticuerpos permite al sistema inmune contar con una variedad relativamente baja de anticuerpos que reconocen antígenos relacionados (sea por su estructura, por poseer grupos funcionales similares o por su conformación) que pueden ser eliminados rápidamente sin necesidad de esperar a que se desarrolle una respuesta inmune específica contra ellos, ya que existen anticuerpos que reconocen a ciertos antígenos aunque con baja afinidad, pero que ayudan a su depuración.

La presencia de anticuerpos que reconocen vimentina se ha reportado no sólo en procesos inflamatorios bacterianos (97), parasitarios (98) y/o virales (99), sino también en el curso de enfermedades reumáticas (100) principalmente en el lupus eritematoso generalizado (101, 102). En un estudio realizado por Blaschek y colaboradores se reporta reactividad cruzada de los anticuerpos de clase IgM detectados en pacientes con LEG contra CL y vimentina (103). Los autores muestran que existe una asociación estadísticamente significativa entre anticuerpos contra vimentina, aCL y anticuerpos contra DNA especialmente con el isotipo IgM que reconoce vimentina. Reportan además, asociación estadística entre aCL y anticuerpos contra DNACs. Los anticuerpos

de clase IgM que reconocen vimentina fueron inhibidos con CL y absorbidos con DNACs.

La presencia de autoanticuerpos en sujetos normales que muestran polirreactividad y comportamiento muy similar al de los anticuerpos reportados en sujetos con enfermedades autoinmunes nos sugiere que los anticuerpos causantes de los procesos inflamatorios patológicos observados en estas enfermedades, pueden ser el resultado de alteraciones en la regulación de la respuesta inmune normal que desencadena, en la mayoría de los casos, incrementos de los autoanticuerpos naturales de la respuesta inmune.

Los genes de las inmunoglobulinas sufren una serie de mutaciones somáticas y cambio de isotipo durante la maduración de la respuesta inmune. Las células B que expresan genes V que han sido rearrreglados son seleccionadas al entrar en contacto con el antígeno lo que hace que las clonas que expresan anticuerpos de alta afinidad por dicho antígeno se expandan preferentemente (104). Al entender el proceso que ocurre en la maduración de la respuesta inmune, surge inmediatamente la pregunta: ¿ocurre el mismo proceso durante la generación de la respuesta inmune contra antígenos propios?

En ratones NZB/NZW F<sub>1</sub>, el cambio de isotipo de IgM a IgG de los anticuerpos anti-DNA edad-dependientes se han asociado con el desarrollo de la nefritis lúpica que lleva a estos animales a la muerte (104, 105). La producción de los anticuerpos anti-DNA de isotipo IgG es dependiente de las células T CD4<sup>+</sup> (106-108) y está estrictamente asociada (como lo describen Hirose y colaboradores) con el haplotipo MHC (109) y con

genes de la cadena  $\beta$  del receptor de células T (110). Por otro lado, Shlomchick y colaboradores reportaron que los genes  $V_H$  de los anticuerpos IgG anti-DNA e IgG con actividad de factor reumatoide relacionados clonalmente y que provienen de los ratones MRL-Mp-*lpr/lpr* son portadores de una gran variedad de mutaciones somáticas (111, 112). Ellos proponen que las clonas que producen estos autoanticuerpos de clase IgG son seleccionados y expandidos a través de mecanismos empujados por antígeno. Además se ha visto que tanto el cambio de isotipo como la selección de clonas con mutaciones somáticas pueden tener un papel crítico en la generación de autoanticuerpos patogénicos. Este hecho es consistente con la hipótesis que postula que las interacciones T-B antígeno dependientes llevan a la producción de autoanticuerpos patogénicos a través de cambio de isotipo y mutación somática.

La mayoría de los autoanticuerpos de clase IgM obtenidos de los ratones autoinmunes y no autoinmunes son codificados por genes  $V_H$  que no han sufrido mutaciones somáticas (113-115). Sin embargo, sólo en algunos de estos trabajos se reporta que la secuencia exacta de los genes  $V_H$  de estos autoanticuerpos corresponde exactamente a la secuencia  $V_H$  de línea germinal (115, 116). El problema estriba, según discuten los autores, en la dificultad de asignar genes  $V_H$  de línea germinal a las secuencias  $V_H$  expresadas, debido a que varios genes  $V_H$  de línea germinal tienen secuencias que difieren sólo en uno o dos nucleótidos con respecto a éstas (117).

Tomando nuevamente el ejemplo de los anticuerpos anti-DNA, en los que se ha demostrado la existencia de mutación somática y cambio de isotipo asociada a aumento de afinidad en anticuerpos patogénicos, aun en este modelo no se ha podido

excluir la posibilidad de la existencia de células B productoras de anticuerpos anti-DNA de clase IgG con alta afinidad que deriven de células B que expresaban IgM dirigida contra antígenos no relacionados (como fosforilcolina) y que al sufrir hipermutación somática y cambio de isotipo dan como resultado células B reactivas contra DNA (118).

Las células B CD5<sup>+</sup> son la principal fuente de autoanticuerpos de clase IgM, incluyendo los anticuerpos anti-DNA de los ratones NZB/NZW F<sub>1</sub> (36, 119, 120), por que la mayoría de las células B expresan genes de la región V que son codificados por línea germinal y muchos autoanticuerpos IgM son codificados por genes V de línea germinal (113-116).

La mayoría de las células B responsables de la producción espontánea de anticuerpos anti-DNA de clase IgM en ratones NZB/NZW F<sub>1</sub>, expresan el marcador CD5. Existen dos posibilidades que explican la producción de autoanticuerpos IgG por células B CD5<sup>+</sup>: una es que las células productoras de estos anticuerpos sean verdaderamente células B convencionales y la otra es que sean células B CD5<sup>+</sup> que han perdido el marcador CD5. Evidencias circunstanciales en ratones NZB/NZW F<sub>1</sub>, favorecen ésta última (121). Estudios más profundos en este sentido van a contribuir al mejor entendimiento del origen de los autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunes.

Queda aún por determinar cuál es la función normal de los aFTC y , si son estos mismos anticuerpos los que se presentan en los procesos patológicos, si es así, es importante el estudio de los fenómenos que ocurren para que los títulos se incrementen en forma tan importante. Por otro lado si éstos anticuerpos no son los mismos, será



importante conocer la relación que tienen con los anticuerpos patológicos y cuál es el inmunógeno que los selecciona e induce a madurar como respuesta inmune.

Kawaguchi reportó la presencia de anticuerpos naturales en ratas y conejos contra ERBr, estos anticuerpos reconocen liposomas de FTC (122). El estudio muestra que existe una vasta producción de anticuerpos contra ERBr en ambas especies como respuesta al reto antigénico dado por lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo de pollo, la respuesta a dicho reto antigénico es inmediata, hecho que apoya los hallazgos que muestran que está presente una gran población de células B productoras de anticuerpos contra ERBr, no sólo en ratones normales sino también en ratas, y conejos normales. Las células B anti-ERBr de las ratas y conejos son probablemente el equivalente de las células B anti-ERBr de los ratones. La abundancia de las células B con especificidad contra ERBr en animales normales de tres diferentes especies y ahora descritos en el hombre, sugiere un papel importante de estas células dentro del sistema inmune ya que se ha conservado filogenéticamente. El blanco real de los anticuerpos contra ERBr aún no se ha determinado. La molécula que posee los epítopes para los anticuerpos contra ERBr es la fosfatidilcolina (26, 27, 28) fosfolípido ubicuo que es componente básico de todas las membranas.

El reconocimiento de eritrocitos almacenados (19, 20) sugiere que los aFTC reconocen eritrocitos que de alguna manera se han modificado y son eliminados al activar la cascada del complemento. Si el envejecimiento *in vitro* (por almacenamiento) de los eritrocitos puede ser igualado al envejecimiento *in vivo*, los hallazgos de que los aFTC se unen a eritrocitos normales envejecidos *in vitro* (19) puede ser de gran

importancia ya que la FTC que es un antígeno oculto de la membrana del eritrocito, al exponerse *in vivo* por efecto de la sialidasa sérica o moléculas con acción similar y/o enzimas proteolíticas que desializan (121) o liberan el componente sialoglicoprotéico, liberan o descubren a los fosfolípidos de la membrana (19). Por otro lado, se ha descrito un anticuerpo natural de clase IgG anti-alfa-galactosil que regula la eliminación de eritrocitos seniles por la unión de los receptores Fc de las células del retículo endotelial (123). Un anticuerpo de clase IgM que reconoce epítopes (fosfatidilcolina) expuestos en los eritrocitos seniles, que origina la destrucción mediada por complemento, puede ser un mecanismo alterno para su depuración.

## 9. CONCLUSIONES

1.- Encontramos anticuerpos contra fosfatidilcolina (aFTC) en el suero de 85% de los sujetos de una población humana normal.

2.- El isotipo de estos anticuerpos es exclusivamente M.

3.- La noción de que los aFL detectados en sujetos sanos reconocen FTC se apoya en los siguientes hallazgos: el reconocimiento de la FTC en la fase sólida (ELISA), el reconocimiento de eritrocitos murinos y humanos tratados con bromelina y la inhibición del reconocimiento con FTC en la fase líquida (micelas).

4.- Los aFTC mostraron una importante reactividad cruzada con estructuras conservadas filogenéticamente como son: DNACd, DNACs, CL y vimentina. Mostraron además reactividad de factor reumatoide.

5.- De acuerdo con los estudios realizados con FTC y porciones de la molécula fue posible determinar el sitio de reconocimiento de los aFTC, que es la fosforilcolina. Para su reconocimiento los aFTC requieren tanto del grupo fosfato como de la cabeza polar (Trimetil amonio). La pérdida del fosfato inhibe totalmente el reconocimiento. Así mismo, se puede concluir que el grupo TMA

requiere tanto de los átomos de carbono como del grupo fosfato para ser reconocido.

6.- Los aFTC de clase IgM detectados en los sujetos normales son fijadores de complemento, por tanto son anticuerpos que tienen la capacidad de lisar las células que reconocen. En otras palabras los aFTC tienen una capacidad hemolítica importante.

7.- La polirreactividad, el isotipo, la presencia en sujetos normales y su concentración coloca a los aFTC dentro del grupo de los autoanticuerpos naturales.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bowie EJW, Thomson JH, Pascuzzi CA, et al. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med.* 1963; 62:416-420.
- 2.- Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1983; 2:1211-1214
- 3.- Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, et al. Measurement of anticardiolipin antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol.* 1985; 62:738-745.
- 4.- Hugues GRV, Harris EN, Gharavi AE. The cardiolipin syndrome. *J Rheumatol.* 1986; 13:486-489.
- 5.- Alarcón-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1989; 16:482-488.
- 6.- Macworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorders. *Ann Rheum Dis.* 1989; 48:362-367.
- 7.- Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: Major clinical and serological features. *Medicine (Balt).* 1989; 68:366-374.
- 8.- Pérez-Vazquez ME, Cabledes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Fall in serum antiphospholipid antibodies levels upon development of nephrotic syndrome in systemic lupus erythematosus patients. Relationship to urinary loss of IgG and to other factors. *Am J Med.* 1992; 92:357-362.
- 9.- Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ. Peripheral vascular syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med.* 1965; 62:907-919.
- 10.- Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A retrospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine.* 1989; 68:353-365.
- 11.- Kamashta MA, Cervera R, Asherson RA, et al. Association of antibodies against phospholipids with heart valve disease in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1990; 335:1541-1544.
- 12.- Walz S, Kong HHP, Silver R. Adrenal failure and the primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1990; 17:836-837.
- 13.- Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Evolución clínica, tratamiento y causas de muerte en 23 pacientes con síndrome de antifosfolípidos primario. (Abstract). *Rev Mex Reumatol.* 1991; 6:39.
- 14.- Ishii Y, Nagasawa K, Mayumi T, Niho Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49:387-390.
- 15.- Delezé M, Alarcón-Segovia D, Oria CV et al. Hemocytopenia in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1989; 16:926-930.

- 16.- Connor J, Bucana C, Fidler IJ, Schroit AJ. Differentiation-dependent expression of phosphatidyl-serine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1989; 88:3184-3188.
- 17.- Alarcón-Segovia D. Pathogenetic potential of antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1988; 15:890-893.
- 18.- Staub HL, Harris EN, Khamashta MA et al. Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis. *Ann Rheum Dis.* 1989; 48: 166-169.
- 19.- Cabral AF, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Hemolytic anemia related to an IgM autoantibodies to phosphatidylcholine that binds *in vitro* to stored and to bromelain-treated human erythrocytes. *J Autoimmunity.* 1990; 3:773-787.
- 20.- Jenkins WJ and Marsh WL. Autoimmune haemolytic anemia. Three cases with antibodies specifically active against stored red cells. *Lancet.* 1961; 1:16-18.
- 21.- Oken M, Griffiths RW, Williams RC, Reimann BEF. Possible NZB syndrome in man. *Arch Intern Med.* 1973; 132: 237-240.
- 22.- Cooper MR, Cohen HJ, Huntley CC et al. A monoclonal IgM with antibodylike specificity for phospholipids in patient with lymphoma. *Blood.* 1974; 43:493-504.
- 23.- Del Papa N, Meroni PL, Barcellini W et al. Antiphospholipid antibodies cross-reacting with erythrocyte membrane. A case report. *Clin Exp Rheumatol.* 1992; 10:395-399.
- 24.- Cunningham AJ. Large number of cells in normal mice produce antibody components of isologous erythrocytes. *Nature.* 1974; 252:749-751.
- 25.- Lord EM, Dutton RW. The properties of plaque-forming cells from autoimmune and normal strains of mice with specificity for autologous erythrocyte antigens. *J Immunol.* 1975; 115:1199-1205.
- 26.- Kawaguchi S. Phospholipid epitopes for mouse antibodies against bromelain-treated mouse erythrocytes. *Immunology.* 1987; 62:11-16.
- 27.- Cox KO, Hardy SJ. Autoantibodies against mouse bromelain-modified RBC are specifically inhibited by a common membrane phospholipid, phosphatidylcholine. *Immunology.* 1985; 55:263-269.
- 28.- Micolino TJ, Arnold LW, Hanghton G. Phosphatidylcholine is recognized by a series of Ly-1+ B cell lymphomas specific for erythrocyte membrane. *J Exp Med.* 1986; 163:155-165.
- 29.- Cook GM, Herd DM and Seaman GVF. A sialomucopolysaccharide liberated by trypsin from the human erythrocytes. *Nature.* 1969; 188:1011-1012.
- 30.- Pirofsky B. Autoimmunization and the autoimmune hemolytic anemias. *Williams and Wilkins.* Baltimore, 1969.
- 31.- Adib M, Ragimbeau J, Avrameas S, Ternynck. IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. *J Immunol.* 1990; 144:3807-3813.

- 32.- Mercolino TJ, Locke AL, Afshari A, Sasser D, Travis WW, Arnold LW and Haughton G. Restricted immunoglobulin variable gene usage by normal Ly-1 (CD5<sup>+</sup>) B cells that recognize phosphatidylcholine. *J Exp Med.* 1989; 169:1869-1877.
- 33.- Casali P, Burastero SE, Nakamura M, Inghirami G and Nalkins AL. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1<sup>+</sup> B cell subset. *Science.* 1987; 236:77-81.
- 34.- Antin JH, Emerson SG, Martin P, Gadol N and Ault KH. Leu-1<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J Immunol.* 1986; 136:505-510.
- 35.- Hardy RR, Hayakawa K, Shimizu M, Yamasaki K and Kishimoto T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1<sup>+</sup> B cells. *Science.* 1987; 236:81-83.
- 36.- Hayakawa KR, Hardy R, Honda M, et al. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81:2494-2498.
- 37.- Mercolino TJ, Arnold LW, Hawkins LA, et al. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidylcholine. Relationship to cell that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. *J Exp Med.* 1988; 168:687-698.
- 38.- Marcos MAR, Huetz F, Pereira P, Andreu JL, Matinez-A C, Coutinho A. Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1989; 19:2031-2035.
- 39.- Pennell CA, Shehan KM Brodeur PH, et al. Organization and expression of V<sub>H</sub> gene families preferentially expressed by Ly-1+ (CD5+) B cells. *Eur J Immunol.* 1989; 19:2115-2121.
- 40.- Conger JD, Sage HJ, Corley RB, et al. Diversity of the available repertoire of murine antibodies react with bromelain-treated isologous erythrocytes. *J Immunol.* 1989 143:4044-4052.
- 41.- Andrade L, Huetz F, Poncet P, et al. Biased V<sub>H</sub> gene expression in murine CD5 B cells results from age-dependent cellular selection. *Eur J Immunol.* 1991; 21:2017-2023.
- 42.- Yoshida S, Castle JJ, Gershwin ME. The pathogenesis of autoimmunity in *New Zealand Mice*. *Semin Arthritis Rheum.* 1990; 19:224-242.
- 43.- Shoenfeld Y, Teplizki HA, Mendlovic S, Blank M, Mozes E, Isenberg DA. The role of the human anti-DNA idiotype 16/6 in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989; 51:313-325.
- 44.- Villarreal GM, Alarcón-Segovia D, Villa AR, Cabral AR and Shoenfeld Y. Presence of a 16/6-related human anti-DNA common idiotype (SA<sub>1</sub>) in the serum of patients with the primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1991; 18:1537-1541.
- 45.- Chen P, Liu M, Sinha S, Carson D. A 16/6 idiotype-positive anti-DNA antibody is encoded by a conserved V<sub>H</sub> gene with no somatic mutation. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:1429-1431.
- 46.- Velasquillo MC, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D, et al. Some patients with primary antiphospholipid syndrome have increased circulating CD5<sup>+</sup> B cells that correlate with levels of IgM antiphospholipid antibodies. *J Clin Exp Rheum.* 1991; 9:501-505.

- 47.- Granados J, Alarcón-Segovia D, Oria CV, Andrade F. Anticardiolipin antibodies (ACLA) in families of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Relationship to complement genotypes. (Abstract). *Arthritis Rheum.* 1987; 30:22.
- 48.- Cabiedes J. Estudio inmunogenético de pacientes con síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos y pacientes con LEG. *Tesis de Licenciatura.* 1989.
- 49.- McHugh NJ, Maddison PJ. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989; 32:1623-1624.
- 50.- Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, et al. Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:124-125.
- 51.- Granados-Arriola J, Vargas-Alarcón G, Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Polimorfismo genético del HLA-DR y HLA-DQ en pacientes con síndrome de antifosfolípido primario (SAFP). (Abstract). *Rev Mex Reumatol.* 1991; 6:21.
- 52.- Granados J, Vargas G, Bekker C, Alarcón-Segovia D. Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients. (Abstract). Fifth International Symposium on Antiphospholipid antibodies. San Antonio Texas. 1992.
- 53.- Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Evolución clínica, tratamiento y causas de muerte en 23 pacientes con síndrome de antifosfolípido primario. (Abstract). *Rev Mex Reumatol.* 1991; 6:39.
- 54.- Alarcón-Segovia D. Pathogenic potential of anti-phospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1988; 15:890-893.
- 55.- Shoenfeld Y, Mozes E. Pathogenic idiotypes of autoantibodies in autoimmunity: lessons from new experimental models of SLE. *FASEB J.* 1990; 4:2646-2651.
- 56.- Mendlovic S, Levy Y, Mozes E. Specific proliferative responses following the induction of experimental SLE in mice. *Immunol Lett.* 1991; 27:69-74.
- 57.- Mendlovic S, Segal R, Shoenfeld Y, Mozes E. Anti-DNA- idiotype- and anti-idiotype-specific T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus and their first-degree relatives. *Clin Exp Immunol.* 1990; 82:504-508.
- 58.- Puccetti A, Koizumi T, Migliorini P, Andre-Schwartz J, Barrett KJ, Schwartz RS. An immunoglobulin light chain from a lupus-prone mouse induces autoantibodies in normal mice. *J Exp Med.* 1990; 171:1919-1930.
- 59.- Welsbart RH, Noritake DT, Wong AL, et al. A conserved anti-DNA antibody idiotype associated with nephritis in murine and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1990; 144:2653-2658.
- 60.- Tatal N, Garry RF, Schur PH, et al. A conserved idiotype and antibodies to retroviral proteins in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1990; 85:1866-1871.
- 61.- Stocks MR, Williams DG, Maini RN. Analysis of a positive feedback mechanism in the anti-Sm autoantibody response of MRL-MPS-*lpr/lpr* mice. *Eur J Immunol.* 1991; 21:267-272.



- 62.- Ruiz-Argüelles A, Vazquez-Prado J, Tenorio-Mendoza C, et al. Anti-idiotypic activity of antiphospholipid antibodies I. Goat antibodies to human coagulation protein C express idiotypes recognized by "natural" and "pathologic" human antiphospholipid antibodies. (Enviado).
- 63.- Canoso RT, Sise HS. Chlorpromazine induced lupus anticoagulant in chlorpromazine-patients. *Am J Hematol.* 1982; 13:121-129.
- 64.- Dubois EL, Tallman E, Wonka RA. Chlorpromazine induced systemic lupus erythematosus. Case report and review of the literature. *J Amer Med Assoc.* 1972; 221:595-596.
- 65.- Alarcón-Segovia D, Fishbein E, Cetina JA, Raya RJ, Becerra E. Antigenic specificity of chlorpromazine-induced antinuclear antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1973; 15:543-548.
- 66.- Colaco CB, Mackie IJ, Irving W, Machin SJ. Anticardiolipin antibodies in viral infections. *Lancet.* 1989; 1:622.
- 67.- Cohen AJ, Phillips TM, Kessler CM. Circulating coagulation inhibition in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1986; 104:175-180.
- 68.- Gold JE, Haubenstock A, Zaluski R. Lupus anticoagulant and AIDS. *New Engl J Med.* 1986; 314:1252-1253.
- 69.- Maclean C, Flegg FJ, Kilpatrick DC. Anticardiolipin antibodies and HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 1990; 81:263-266.
- 70.- Gharavi AE, Harris EN, Asherson RS, et al. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis.* 1987; 46:1-6.
- 71.- Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Hemolytic anemia (HA) in systemic lupus erythematosus (SLE) associates strongly with IgM anti-phosphatidylcholine antibodies (aPTC). (abstract). *Clin Exp Rheumatol.* 8:212.
- 72.- Loizou S, Mackworth-Young CG, Cofier C, Walport MJ. Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipids of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and with syphilis. *Clin Exp Immunol.* 1990; 80:171-176.
- 73.- Qamar T, Gharavi AE, Levy RA, Lockshin MD. Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds. *J Clin Immunol.* 1990; 10:200-203.
- 74.- Rauch J, Tannenbaum M, Tannenbaum H, Ramelson H, Cullis FR, Tilcock CPS, Hope MJ, Janoff AS. Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid system. *J Biol Chem.* 1986; 261:9672-9677.
- 75.- Rauch J, Janoff AS. Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: Evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phase in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:4112-4114.
- 76.- Costello PS, Powell GL, Green FA. The structural requirements for anticardiolipin antibody binding in sera from patients with syphilis and SLE. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990; 53:393-400.
- 77.- Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR, Habina L, Lockshin MD. Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody. *J Clin Immunol.* 1990; 10:141-145.

- 78.- Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood*. 1987; 70:69-76.
- 79.- McNeil HP, Chesterman CN, Kritis SA. Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br J Haematol*. 1989; 73:506-513.
- 80.- Valesini G, Viol F, Ferro D, Quintarelli C, Falco A, Tincani A, Balestrieri G, Balsano F. Anticardiolipin antibodies possess anticoagulants activity which is blocked by a monoclonal antibody against a cross reacting Idiotypic of antiphospholipid antibodies. *Clin Exp Immunol*. 1989; 7:615-622.
- 81.- Branch DW, Rote NS, Dostal DA, Scott JR. Association of anticoagulant with antibody against phosphatidylserine. *Clin Immunol Immunopathol*. 1987; 42:63-75.
- 82.- Vismara A, Meroni PL, Tincani A, et al. Relationship between anticardiolipin and antilethelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 1988; 74:247-253.
- 83.- Hasselaar P, Derksen RHWM, Blokzijl L, De Groot PG. Thrombosis associated with antiphospholipid antibodies cannot be explained by effects on endothelial and platelet prostanoid synthesis. *Thromb Haemostas*. 1988; 59:80-85.
- 84.- McNeil PH, Simpson RJ, Chesterman CN, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that include a lipid binding inhibitor of coagulation: beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:4120-4124.
- 85.- Galli M, Comfurius F, Maasen C, et al. Anticardiolipin antibodies directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. *Lancet*. 1990; 335:1544-1547.
- 86.- Matsumura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin Cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*. 1990; 338:177-178.
- 87.- Schousboe I. Beta<sub>2</sub>-glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*. 1985; 66:1086-1091.
- 88.- Alarcón-Segovia D, Cabral AR. Functional and immunochemical heterogeneity of antiphospholipid antibodies: a classification. *J Rheumatol*. 1992; 19:1166-1169.
- 89.- Cabral AR, Cabeldes J, Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J. Phospholipid specificity and requirement of  $\beta_2$ glycoprotein-I for reactivity of antibodies from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity*. (En prensa).
- 90.- Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaals RFA. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost*. 1991; 66:629-632.
- 91.- Reininger L, Shibata T, Shumans S, et al. Spontaneous production of anti-mouse red blood cell autoantibodies is independent of the polyclonal activation in NZB mice. *Eur J Immunol*. 1990; 20:2405-2410.
- 92.- Guzmán J, Cabral AR, Cabeldes J, Pita Ramírez J, Alarcón-Segovia D. Anticuerpos antifosfolípido en anemia hemolítica autoinmune idiopática (Abstract). *Rev Mex Reumatol*. 1991; 6:10.

- 93.- Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Anticuerpos anti-fosfatidilcolina (aFTC) en lupus eritematoso generalizado (LEG). Asociación con anemia hemolítica (abstr). *Rev Mex Reumatol.* 1990; 5:55.
- 94.- Koike T, Ichikawa K. Immunological aspects of monoclonal anti-cardiolipin antibodies derived from SLE prone mice. *Proceedings of the second international conference on systemic lupus erythematosus.* Singapore 1989; 146-154.
- 95.- Laemmli UR. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature.* 1970; 227:680.
- 96.- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from SDS and acid/urea polyacrylamide gels to nitrocellulose Sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76:4350-4354.
- 97.- Bratherton L, Toh BH, Jack I. IgM antibody to intermediate filaments in *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Clin Immunol Immunopathol.* 1981; 18:425-430.
- 98.- Boehme MWJ, Evans DA, Miles MA, Holborow EJ. Occurrence of autoantibodies to intermediate filament proteins in human visceral leishmaniasis and their induction by experimental polyclonal B-cell activation. *Immunology.* 1986; 59:583-588.
- 99.- Kataaha PK, Mortazavi-Milani SM, Russell G, Holborow EJ. Anti-intermediate filaments antibodies, antikeratin antibody, and antiperinuclear factor in rheumatoid arthritis and infectious mononucleosis. *Ann Rheum Dis.* 1985; 44:446-449.
- 100.- Kurki P, Hekve T, Virtanen I. Antibodies to cytoplasmic intermediate filaments in rheumatic disease. *J Rheumatol.* 1983; 10:558-562.
- 101.- Senecal JL, Rauch J. Hybridoma lupus autoantibodies can bind major cytoskeletal filaments in the absence of DNA-binding activity. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:864-875.
- 102.- Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Cross reactivity between antiphospholipid antibodies and vimentin. (En preparación).
- 103.- Blaschek MA, Boehme M, Jouquan J, et al. Relation of antivimentin antibodies to anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1988; 47:708-716.
- 104.- Rajewsky K, Förster I, Cumano A. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science.* 1987; 238:1088-1094.
- 105.- Steward M, Hay FC. Changes in immunoglobulin class and subclass of anti-DNA antibodies with increasing age in *NZBW F<sub>1</sub>* hybrid mice. *Clin Exp Immunol.* 1976; 28:363-370.
- 106.- Sekigawa I, Ishida Y, Hirose S, et al. Cellular basis of *in vitro* anti-DNA antibody production: evidence for T cell dependence of IgG-class anti-DNA antibody synthesis in the (*NZBxNZW*) F<sub>1</sub> hybrid. *J Immunol.* 1986; 136:1247-1252.
- 107.- Sekigawa I, Okada T, Noguchi K et al. Class-specific regulation of anti-DNA antibody synthesis and the aged-associated changes in (*NZBxNZW*) F<sub>1</sub> hybrid mice. *J Immunol.* 1987; 138:2890-2895.

- 108.- Wofsy D, Chiang NY. Proliferation of Ly-1 B cell in autoimmune NZB and (NZBxNZW) F<sub>1</sub> mice. *Eur J Immunol.* 1987; 17:809-814.
- 109.- Hirose S, Ueda G, Noguchi K, et al. Requirement of H-2 heterozygosity for autoimmunity in (NZBxNZW) F<sub>1</sub> hybrid mice. *Eur J Immunol.* 1986; 16:1631-1633.
- 110.- Hirose S, Tokushige K, Kinoshita K, et al. Contribution of the linked to the T cell receptor B chain gene complex of NZW mice to the autoimmunity of (NZBxNZW) F<sub>1</sub> mice. *Eur J Immunol.* 1991; 21:823-826.
- 111.- Shlomchik MJ, Aucouin AH, Pisotsky DS, Weigert MG. Structure and function of anti-DNA antibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:9150-9154.
- 112.- Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A, Wolfowicz CB, et al. The role of clonal selection and mutation in autoimmunity. *Nature.* 1987; 328:805-811.
- 113.- Baccala R, Quang TV, Gilbert M, et al. Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germ-line genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:4624-4628.
- 114.- Siminovitch KA, Misener V, Kwong PC et al. A natural autoantibody is encoded by germ line heavy and lambda light chain variable region genes without somatic mutation. *J Clin Invest.* 1989; 84:1675-1676.
- 115.- Behar SM, Scharff MD. Somatic diversification of the S107 (T15) V<sub>H</sub>11 germ-line gene that encoded the heavy-chain variable region of antibodies to double-stranded DNA (NZBxNZW) F<sub>1</sub> mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:3970-3974.
- 116.- Trepicchio Jr W, Maruya A, Barrett KJ. The heavy chain genes of a lupus anti-DNA autoantibody are encoded in the germ line of a nonautoimmune strain of mouse and conserved in strains of mice polymorphic for this gene locus. *J Immunol.* 1987; 139:3139-3145.
- 117.- Brodeur PH, Riblet R. The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) in the mouse I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur J Immunol.* 1984; 14:922-930.
- 118.- Diamond B, Scharff MD. Somatic mutation of the T15 heavy chain gives rise to an antibody with autoantibody specificity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81:5841-5844.
- 119.- Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Harzenberg LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in the normal, immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med.* 1983; 157:202-218.
- 120.- Shirai T, Hirose S, Okada T, Nishimura H. CD5<sup>+</sup> B cell in autoimmune disease and lymphoid malignancy. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991; 59:173-186.
- 121.- Clark MR. Senescence of red blood cells: Progress and problems. *Physiol Review.* 1988; 68:503-554.
- 122.- Kawaguchi S. Antiphospholipid antibodies reactive with Bromelain-treated mouse erythrocytes in mice, rats and rabbits. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991; 96:46-50.
- 123.- Galili U, Flechner I, Knyszynski A et al. The natural anti- $\alpha$ -galactosyl IgG on human senescent red blood cells. *Br J Hematol.* 1986; 62: 317-324.