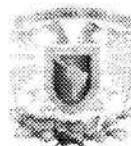


11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
SEDE SUR

TRABAJO EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

CORRELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-NUCLEOSOMA
CON LA ACTIVIDAD Y DAÑO CRÓNICO EN PACIENTES CON
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO.

ALUMNO: JESÚS ABRAHAM SIMÓN CAMPOS.

SEDE: DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN.

TUTOR: DR. JORGE ALCOCER VARELA.

COTUTOR: JAVIER CABIEDES CONTRERAS

México DF. 2005-/



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

A mi Esposa y Amiga Effy.

A mis hijos Sofía y Jacobo.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JESÚS A. SIMÓN

FECHA: 7-01-04

FIRMA: 

Un agradecimiento a mi Maestro y Tutor

Dr. Jorge Alcocer-Varela,

por sus enseñanzas, su tolerancia

y sobre todo por

su amistad.

Un agradecimiento especial a mi Profesora

Dra. Florencia Vargas

por sus enseñanzas y apoyo incondicional,

pero sobre todo

por su cariño y amistad.

Un agradecimiento a todas las personas que colaboraron en el estudio de
los anticuerpos anti-cromatina.

Dr. Javier Cabiedes-Contreras.

Dr. Jorge Sánchez-Guerrero.

Dr. Enrique Ortiz.

Dr. Donato Alarcón-Segovia.

Dr. Zahir Amoura.

Dr. Henry Chabre.

Dr. Luis Felipe Flores-Suárez

Dra. Hilda Fragosó.

Dr. Rubén Montúfar.

Dr. Jorge Rojas-Serrano

Dra. Sophie Musset.

Dra. Patrice Pascal.

Dr. Jean C. Piette.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.	7
II. MARCO TEÓRICO	8
1. Los nucleosomas.	8
2. El origen de la hipótesis.	9
3. El origen de los nucleosomas.	11
4. El papel de los nucleosomas en la fisiopatología del LEG.	12
5. Integración de la teoría.	14
6. Anticuerpos anti-nucleosoma.	15
a) Prevalencia de los anticuerpos anti-cromatina en las enfermedades reumáticas.	16
b) Utilidad de los anticuerpos anti-cromatina en el diagnóstico del LEG.	17
c) Utilidad de los anticuerpos anti-cromatina como marcador de actividad.	19
d) Anticuerpos anti-nucleosoma en pacientes con LEG negativos para los anti-DNA.	21
e) Utilidad de los anticuerpos anti-nucleosoma en el seguimiento de pacientes con LEG.	22
f) Anticuerpos anti-nucleosoma en pacientes con síndrome antifosfolípido primario.	22
III. CONCLUSIONES.	24
IV. TRABAJO PRINCIPAL.	25
1. Introducción.	26
2. Material y Métodos.	27
a) Anticuerpos anti-cromatina.	27
b) Análisis estadístico.	28
3. Resultados.	29
a) Anticuerpos anti-cromatina y su correlación con la actividad.	30
b) Pacientes anti-DNA negativos.	32
c) Pacientes anti-nucleosoma negativos	34
d) Pacientes anti-histonas negativos.	34
e) Interacción entre los anticuerpos anti-cromatina.	36
f) Anticuerpos anti-cromatina en pacientes con LEG y remisión.	37
4. Discusión.	38
5. Bibliografía.	42

I. INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune de causa desconocida, que representa el prototipo de las enfermedades en donde el daño esta mediado por autoanticuerpos [1]. Se han descrito diversos anticuerpos asociados a esta enfermedad, pero su utilidad para el diagnóstico y como marcador de actividad ha sido limitada. Uno de los anticuerpos más estudiados y que han sido considerados como los principales responsables del desarrollo de nefritis en pacientes con LEG son lo anticuerpos anti-DNA de cadena doble (anti-DNAcd) [1,2]. Estos anticuerpos han sido utilizados como un marcador de actividad del LEG; sin embargo solo se encuentran en el 50% de los pacientes y no siempre tienen correlación con la actividad de la enfermedad [2,3]. Por otro lado, los anticuerpos de mayor prevalencia (anti-nucleares) carecen de especificidad, ya que están presentes en la mayoría de las enfermedades reumáticas e incluso en población sana [4]. De tal forma que si consideramos al LEG como una enfermedad dependiente de anticuerpos, resulta pertinente la búsqueda de otros anticuerpos que puedan explicar la fisiopatología del LEG y adicionalmente puedan ser utilizados en el diagnóstico y como un marcador de actividad y daño orgánico.

Recientemente se ha postulado que los nucleosomas representan el principal antígeno en la fisiopatología del LEG y que los anticuerpos anti-

nucleosoma (anti-NCS) pudieran explicar la aparición de daño renal [5-9]. Es por eso que durante la realización de la maestría decidimos evaluar la utilidad clínica de los anticuerpos anti-NCS en pacientes con LEG.

1. LOS NUCLEOSOMAS

El genoma humano esta constituido por cerca de 6×10^9 pares de bases de DNA, divididos en 22 autosomas y 2 cromosomas sexuales, los cuales se almacenan en un cubo de apenas $1.9 \mu\text{m}$ por lado. Esto no podría ser posible sin una adecuada organización y empaquetamiento del DNA. Es así, como la subunidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma [10,11], el cual esta constituido por aproximadamente 200 pares de bases de DNA, organizados alrededor de un núcleo ($6 \times 11 \text{ nm}$) conformado por un octámero de 2 copias de cada una de las proteínas básicas conocidas como histonas (H2A, H2B, H3 y H4). De tal manera que en la cromatina, el DNA se extiende como una doble cadena continua, enrollada (2 vueltas por nucleosoma) sobre la superficie de las histonas [11]. Cada nucleosoma esta separado por una región de DNA libre de histonas, que tiene un tamaño aproximado de 0-80 nucleótidos. Un gen eucarionte típico (de 10^3 nucleótidos) podría estar asociado con 50 nucleosomas y cada célula humana (que tiene 6×10^9 pares de bases de DNA) puede contener alrededor de 3×10^7 nucleosomas [11]. Además de las histonas del núcleo, existe

una histona extranuclear, conocida como H1 que corresponde al sitio de anclaje de la cadena continua de DNA [10].

2. EL ORIGEN DE LA HIPÓTESIS

A pesar del avance en el conocimiento de la fisiopatología del LEG, todavía existe un debate acerca del origen de las células auto-reactivas en pacientes con esta enfermedad. Sin embargo, hay algunas evidencias que han inclinado la balanza hacia la hipótesis de que el LEG es una enfermedad dependiente del reconocimiento de un antígeno y no de células auto-reactivas provenientes de la línea germinal. En primer término la mayoría de los anticuerpos patogénicos encontrados en el LEG son de isotipo IgG, esto es, han sufrido un cambio de isotipo IgM a IgG (*switching*) [12]. Por otro lado, el análisis de las regiones V_H de estos anticuerpos muestran hipermutación somática y ambos fenómenos ocurren después del reconocimiento de un antígeno [13].

Estas observaciones dieron origen al trabajo de Chandra Mohan *et al* [14], quienes investigaron los posibles antígenos responsables de la aparición de células T auto-reactivas, tanto en el modelo murino (ratones NZB/SWR y NZB/NZW), como en pacientes con LEG. Ellos aislaron cerca de 800 clones de células T auto-reactivas, las cuales fueron cocultivadas con células B obtenidas de tejido esplénico y fueron sometidas a estímulo con diferentes antígenos.

Encontraron que solo alrededor del 10^o de estas células T inducían a la producción de anticuerpos anti-DNAcd, mientras que más del 50^o eran específicas para los nucleosomas. Por otro lado, el estímulo con los antígenos DNAcd, DNA de cadena simple e histonas solo produjo un leve incremento en la producción de anticuerpos, mientras que la estimulación con el antígeno nucleosoma incrementó cerca de 160 veces la producción de inmunoglobulinas. Esta fue una de las primeras evidencias que llevaron a pensar que un antígeno complejo como el nucleosoma, podría ser el responsable de la aparición del LEG y no el DNA como se había pensado.

El siguiente paso en la investigación de los nucleosomas fue determinar el comportamiento de los anticuerpos anti-NCS a lo largo de la enfermedad, para lo cual Zahir Amoura *et al* [15], llevaron a cabo un estudio en ratones MRL *lpr/lpr* y MRL+/+ a los cuales les midieron los niveles séricos de 3 diferentes anticuerpos anti-cromatina (anti-NCS, anti-DNAcd y anti-histonas –anti-HST-) con intervalos de 2 semanas entre la semana 8 y 32 de vida. Ellos encontraron que la aparición de los anticuerpos anti-NCS precedió a la de otros anticuerpos anti-cromatina e incluso en el ratón MRL+/+ a la semana 32 el 100% tenían anticuerpos anti-NCS y solo el 50% anti-DNAcd, lo cual es similar a lo encontrado en pacientes con LEG.

El paso final en la generación de esta teoría fue determinar si los resultados observados en el modelo murino podrían ser reproducidos en pacientes con LEG. Fue el mismo grupo de investigadores [16] quién realizó un estudio en pacientes con LEG para determinar la prevalencia de los anticuerpos anti-cromatina, en donde se pudo demostrar que la prevalencia de los anticuerpos anti-NCS era superior a la de los otros anticuerpos anti-cromatina.

3. EL ORIGEN DE LOS NUCLEOSOMAS

La fuente principal de los nucleosomas circulantes es la proteólisis por endonucleasas durante la apoptosis, y se encuentran en los llamados cuerpos apoptóticos, conjuntamente con otros elementos del núcleo y el citoplasma (Ro, La y RNP) que también han sido involucrados en la patogénesis del LEG [17]. De tal forma, que resultaba indispensable determinar si los pacientes con LEG tenían un incremento en la apoptosis, lo cual pudiera explicar un incremento en los nucleosomas circulantes. Es así, como Woodruff Emlen *et al* [18] llevaron a cabo un estudio para determinar el porcentaje de linfocitos en apoptosis en pacientes con LEG, utilizando como grupo control pacientes con artritis reumatoide y sujetos sanos. Ellos pudieron de esta manera mostrar que los pacientes con LEG tenían un incremento significativo en los niveles de linfocitos en apoptosis comparado con los grupos control. Además, pudieron demostrar

una correlación entre la apoptosis y la actividad de la enfermedad. Estos resultados dieron origen al siguiente trabajo, que tuvo por objetivo determinar si este incremento en la apoptosis pudiese traducir un incremento en los nucleosomas circulantes. Zahir Amoura *et al* [19] realizaron un estudio en 58 pacientes con LEG a los cuales les determinaron a través de ELISA de captura las concentraciones de nucleosomas circulantes, comparándolos con 93 sujetos sanos. Encontraron que los pacientes con LEG tuvieron un incremento significativo de los nucleosomas circulantes comparado con los controles.

4. EL PAPEL DE LOS NUCLEOSOMAS EN LA FISIOPATOLOGÍA

DEL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

El papel de los nucleosomas en la patogénesis del LEG, fue establecido desde el estudio inicial de Chandra Mohan *et al* [14], quienes a través de estudiar dos grupos ratones NZB/SWR evaluaron el efecto de los nucleosomas en el desarrollo de la nefropatía. Al primer grupo se le administró placebo y al segundo nucleosomas por vía subcutánea. La historia natural del desarrollo de nefropatía puede representarse en el grupo placebo, en donde a la semana 24 el 10% había desarrollado nefropatía mientras que en el grupo inoculado con nucleosomas el 70% la desarrolló. Esta tendencia se mantuvo en la semana 40 en donde el 50% del grupo control desarrollo nefropatía vs. el 100 % de los ratones inoculados.

Años más tarde, Van Brugen *et al* [20] encontraron en el ratón BALB/c que todos los anticuerpos anti-cromatina podían formar complejos antígeno-anticuerpo con los nucleosomas y que la presencia de este antígeno era indispensable para el desarrollo de nefropatía, tanto *in vivo* como *in vitro*. Es importante decir que estos experimentos también fueron llevados a cabo con otros antígenos nucleares como son DNAd e histonas y los resultados no pudieron reproducirse, lo cual plantea la importancia del antígeno nucleosoma en la génesis del daño renal.

Otras vías de participación de los nucleosomas en la generación de daño han sido exploradas. Como sabemos uno de los mecanismos de mayor importancia en la fisiopatología del LEG es la presencia de una deficiente fagocitosis, que se ha planteado puede llevar a un incremento de los complejos inmunes circulantes y con esto un mayor riesgo de su depósito a nivel de los tejidos. Diego Laderach *et al* [21] evaluaron el papel de los nucleosomas en la fagocitosis de tímocitos en cultivos de macrófagos obtenidos de ratones MRL +/+ comparados con ratones no autoinmunes. Previo al ensayo se determinó el índice de fagocitosis en ambos grupos para descartar una deficiencia intrínseca. Fue claro el hecho que la adición de nucleosomas a los cultivos, inhibió en forma dosis dependiente la fagocitosis hasta lograrse una inhibición del 80% a una concentración de nucleosomas de 80 μ gr/ml. Finalmente, David Bell *et al* [22] evaluaron el papel de los nucleosomas en la proliferación celular y su capacidad

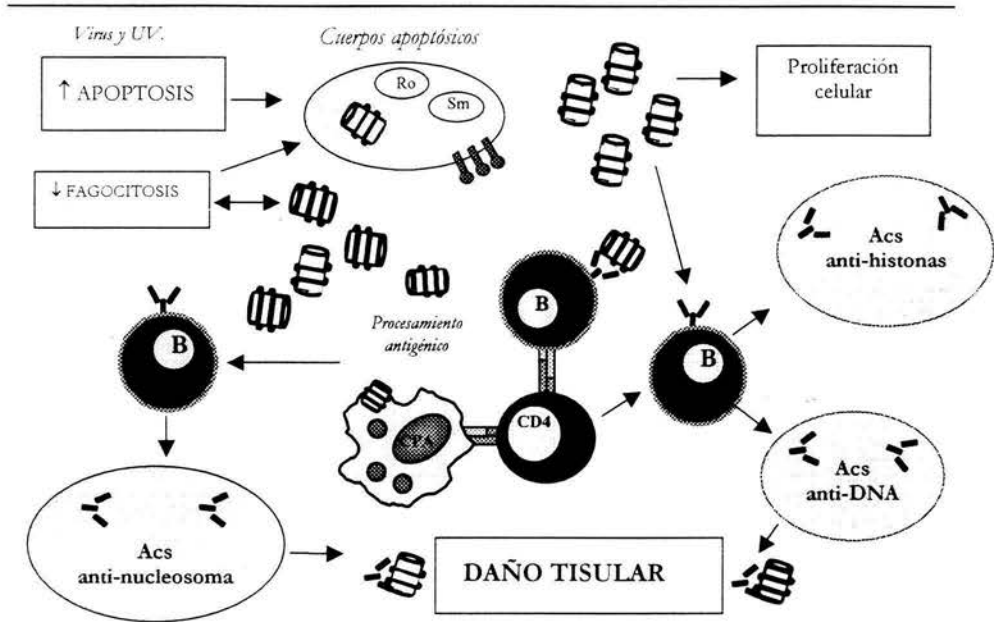
para inducir producción de inmunoglobulinas. Como control utilizaron ratones estimulados con el factor activador de células B y encontraron que tanto la proliferación celular como la producción de inmunoglobulinas fue similar a la encontrada con este factor activador. Lo anterior confirmó que los nucleosomas además de tener efectos en la inhibición de la fagocitosis puede tener un impacto en la proliferación celular y la producción de inmunoglobulinas.

5. INTEGRACIÓN DE LA TEORÍA

Esta teoría puede resumirse en la figura 1. Se ha demostrado que en los pacientes con LEG existe un incremento en la apoptosis, lo cual se traduce en un incremento de los nucleosomas circulantes. Se ha mostrado también como los nucleosomas no solamente pueden inhibir la fagocitosis de cuerpos apoptóticos, lo cual genera un círculo vicioso que lleva a una mayor concentración de nucleosomas circulantes, sino que además pueden inducir a proliferación celular y a un incremento en la producción de inmunoglobulinas. El reconocimiento del antígeno nucleosoma por parte de las células presentadoras de antígeno puede llevar al desarrollo de células T específicas para nucleosomas, lo que a su vez induce la producción de anticuerpos anti-NCS y tardíamente (posiblemente durante el procesamiento antigénico) puede culminar con la presentación de antígenos menores que lleven a la producción de anticuerpos anti-DNAcd y anti-

HST. Finalmente se ha mostrado que la presencia de los nucleosomas es indispensable para la generación de daño renal al formar complejos inmunes con los diferentes anticuerpos anti-cromatina.

Figura 1. Participación de los nucleosomas en la fisiopatología del LEG



6. ANTICUERPOS ANTI-NUCLEOSOMA

La unidad fundamental de organización de la cromatina es el nucleosoma; es por eso que aquellos anticuerpos capaces de reconocer antígenos del nucleosoma han sido llamados como anticuerpos anti-cromatina. Esta compleja familia de anticuerpos esta constituida por los anticuerpos anti-DNAcd que reconocen las áreas de DNA no cubiertas por histonas, los anticuerpos anti-HST

que reconocen las histonas no cubiertas por DNA y un grupo de anticuerpos recientemente descritos, que reconocen exclusivamente las áreas de sobreposición DNA/histonas que han sido llamados como anticuerpos anti-NCS. La evaluación de la utilidad clínica de estos anticuerpos fue el objetivo principal de la realización de esta tesis.

a) Prevalencia de los anticuerpos anti-cromatina en las enfermedades reumáticas. El primer paso en el estudio de los anticuerpos anti-NCS fue determinar su prevalencia en las diferentes enfermedades reumáticas y en población sana. Para esto, estudiamos un grupo de 261 pacientes con 11 diferentes enfermedades reumáticas y 130 sujetos sanos [23]. Al igual que lo encontrado en población francesa y alemana [8-9], pudimos confirmar que la presencia de los anticuerpos anti-NCS se restringe al LEG y a la enfermedad mixta del tejido conectivo. En otras enfermedades como las vasculitis primarias, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren, la esclerosis generalizada progresiva, el síndrome anti-fosfolípido primario la prevalencia de estos anticuerpos fue menor al 7% (tabla 1) y en sujetos sanos fue menor al 3%. Estos resultados dieron pie a la hipótesis de que los anticuerpos anti-NCS podrían ser útiles en el diagnóstico del LEG.

Tabla 1. Anticuerpos anti-cromatina en pacientes con enfermedades reumáticas

Enfermedad	N	Anti-HST (%)	Anti-DNAcd (%)	Anti-NCS (%)
Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo	50	12	30	70
Síndrome antifosfolípido primario	31	6	6	3
Vasculitis Primaria *	70	0	0	0
Síndrome de Sjögren	50	0	4	4
Miopatías inflamatorias	40	5	0	5
Escleroderma	20	0	0	5

* Incluye arteritis de Takayasu, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, poliangitis microscópica, púrpura de Henöch-Schöenlein y enfermedad de Behçet.

a) Utilidad de los anticuerpos anti-cromatina en el diagnóstico del LEG.

Los estudios preliminares realizados en población francesa por Zahir Amoura *et al* [7] y por Anne Bruns *et al* [8] en pacientes alemanes, mostraron que la utilidad de los anticuerpos anti-NCS no era superior a la utilidad de los anticuerpos anti-DNAcd, que han sido considerados como patognomónicos del LEG (tablas 2 y 3). Sin embargo, es importante decir que los pacientes incluidos en estos dos estudios tuvieron una media de evolución del LEG de 8 años, por lo cual resulta difícil extrapolar estos resultados al terreno del diagnóstico del LEG, que habitualmente ocurre durante el primer año de evolución (reciente inicio). Por otro lado, el comportamiento de los anticuerpos anti-cromatina en el modelo murino ha permitido conocer que los anticuerpos anti-NCS aparecen desde las fases tempranas de la vida [15], lo cual planteaba que el grupo ideal de estudio era

el de pacientes con LEG de reciente inicio. Es por eso que decidimos estudiar una población homogénea de 73 pacientes LEG [24], todos ellos con menos de un año del inicio de los síntomas, con el objeto de determinar la utilidad de los anticuerpos anti-NCS para el diagnóstico del LEG. Como grupos control incluimos 130 sujetos sanos y cerca de 300 pacientes con 11 diferentes enfermedades reumáticas. Encontramos que al comparar pacientes con LEG y sujetos sanos, la sensibilidad de los anti-NCS para el diagnóstico de LEG fue del 100%, con una especificidad del 97% (tabla 2). En contraste, los anti-DNAc mostraron una sensibilidad del 63% y una especificidad del 95%.

Tabla 2. Utilidad de los anticuerpos anti-NCS para diferenciar lupus de sujetos sanos.

	* Amoura	* Bruns	** Simón
Sensibilidad	72	56	100
Especificidad	79	97	97
Valor predictivo positivo	86	96	97
Valor predictivo negativo	75	63	100
Razón de verosimilitud	3.4	18.6	∞

* Pacientes con lupus eritematoso generalizado de larga evolución

** Pacientes con lupus eritematoso generalizado de reciente inicio

Estos resultados fueron similares al utilizar como grupo control los pacientes con enfermedades reumáticas (tabla 3). Como hallazgos secundarios encontramos una alta correlación con la actividad de la enfermedad.

Tabla 3. Utilidad de los anticuerpos anti-NCS para diferenciar lupus de pacientes con enfermedades reumáticas.

	* Amoura	* Bruns	** Simón
Sensibilidad	72	56	93
Especificidad	90	94	97
Valor predictivo positivo	72	94	91
Valor predictivo negativo	90	59	98
Razón de verosimilitud	7.2	9.3	31.0

* Pacientes con lupus eritematoso generalizado de larga evolución

** Pacientes con lupus eritematoso generalizado de reciente inicio

c) Utilidad de los anticuerpos anti-cromatina como marcador de actividad.

Debido a la correlación encontrada entre la actividad del LEG y los títulos de anticuerpos anti-NCS, decidimos realizar un estudio (motivo de la tesis de maestría) enfocado a evaluar la utilidad de los anticuerpos anti-cromatina como marcadores de actividad de la enfermedad [25]. En este trabajo incluimos 75 pacientes con LEG y encontramos que todos los anticuerpos anti-cromatina tuvieron una alta correlación con la actividad del LEG, pero esta fue

significativamente mayor con los anticuerpos anti-NCS (tabla 4). Encontramos además una fuerte asociación con la presencia de daño renal.

Tabla 4. Correlación de los anticuerpos anti-NCS con la actividad en pacientes con lupus eritematoso generalizado.

Duración del	Interacción con anti-DNAc	rho	Valor de p
LEG		Spearman	
< un año			
	Global	0.481	< 0.0001
	Anti-dsDNA negativo	0.580	< 0.0001
> un año			
	Global	0.601	< 0.0001
	Anti-dsDNA negativo	0.828	< 0.0001

Estos resultados dieron lugar a la realización de un estudio de casos y controles con el objeto de confirmar la asociación entre los anticuerpos anti-NCS y el desarrollo de nefropatía [26]. En este trabajo incluimos 177 pacientes con LEG de los cuales 30 tuvieron daño renal y 147 no. En estos pacientes se estudiaron un total de 15 diferentes anticuerpos, y encontramos que los únicos anticuerpos con una fuerte asociación con la presencia de daño renal fueron los anticuerpos anti-cromatina. Los otros anticuerpos estudiados, como anti-Ro,

anti-La, anti-Sm, anti-Jo1 etc. parecen tener una participación marginal en el desarrollo de nefropatía.

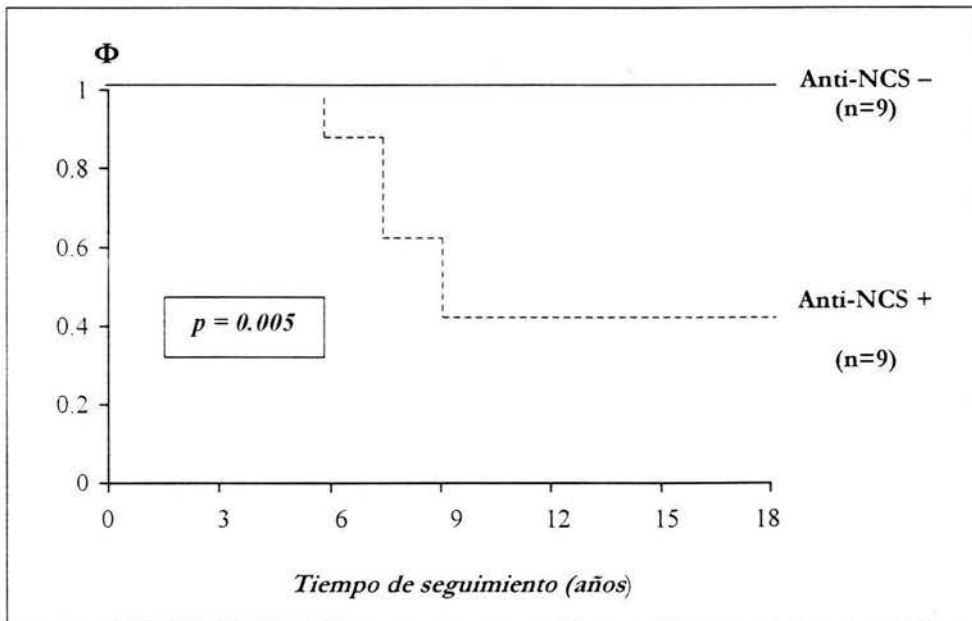
d) Anticuerpos anti-NCS en pacientes con LEG negativos para los anticuerpos anti-DNAcd. Uno de los mayores retos para el clínico es el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con LEG que son negativos para los anticuerpos anti-DNAcd, debido a que en ellos no se cuenta con una prueba diagnóstica de alta especificidad, ni con un marcador de actividad. Es por eso, que decidimos estudiar un subgrupo de pacientes con LEG negativos para los anticuerpos anti-DNAcd [27]. En total estudiamos 70 pacientes con LEG y encontramos que en los pacientes con inicio reciente de la enfermedad, la prevalencia de los anticuerpos anti-NCS fue del 100%. Además, pudimos encontrar una alta correlación con la actividad de la enfermedad (tabla 4), así como una fuerte asociación con la presencia de daño renal. De esta manera además de mostrar la utilidad de los anti-NCS en los pacientes negativos para los anti-DNAcd, se pudo plantear un mecanismo alterno en la generación nefropatía en ausencia de los anticuerpos anti-DNAcd y que puede estar mediado por los anticuerpos anti-NCS.

e) Utilidad de los anticuerpos anti-NCS en el seguimiento de los pacientes con LEG. La mayoría de los estudios realizados, para evaluar la utilidad de los anticuerpos anti-NCS como marcador de actividad fueron de tipo transversal, de tal forma que era importante determinar si estos anticuerpos eran sensibles al cambio. Para esto realizamos un estudio [28] en el cual incluimos 20 pacientes con LEG, los cuales fueron seguidos durante una media de 2 años, con determinaciones repetidas de 15 diferentes anticuerpos. Encontramos que los anticuerpos anti-cromatina tuvieron una fuerte sensibilidad al cambio, especialmente los anticuerpos anti-NCS, mientras que los anticuerpos restantes no.

f) Anticuerpos anti-NCS en pacientes con síndrome anti-fosfolípido primario (SAFp). El momento preciso del desarrollo de los anticuerpos anti-cromatina en pacientes con LEG no se conoce, pero en el modelo murino de lupus se ha podido mostrar que puede ocurrir desde fases tempranas de la vida. De esta manera se planteó la hipótesis de que la aparición de los anticuerpos anti-NCS pudiera ocurrir antes del desarrollo de las manifestaciones del LEG. Es por eso que decidimos evaluar una cohorte de 18 pacientes con SAFp, quienes representan un grupo de riesgo para el desarrollo de LEG [29]. En este grupo encontramos que después de una media de 11 años de seguimiento, 6 pacientes desarrollaron LEG y todos ellos fueron positivos para los anticuerpos anti-NCS

incluso 15 años antes del desarrollo de las manifestaciones del LEG (figura 2). Estos resultados son interesantes porque plantean que la presencia de anticuerpos anti-NCS en población de alto riesgo para el desarrollo de LEG como son los pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune o bien familiares de pacientes con LEG, pudiera ser un factor predictor del desarrollo del LEG.

Figura 2. Probabilidad de mantenerse libre de LEG



III. CONCLUSIONES

Los trabajos aquí presentados apoyan la participación de los anticuerpos anti-cromatina, especialmente los anti-NCS, en el desarrollo de las manifestaciones LEG y muestran los diferentes escenarios en los cuales la medición de estos anticuerpos pudiera ser útil. La utilidad clínica de los anticuerpos anti-NCS se resume a continuación.

- Discrimina sujetos sanos de pacientes con LEG.
- Es un auxiliar en el diagnóstico diferencial entre el LEG y otras enfermedades reumáticas, exceptuando EMTC.
- Puede ser utilizado como un marcador de actividad, especialmente de daño renal
- Es útil en el diagnóstico y como marcador de actividad en pacientes con LEG negativos para los anti-DNAcd.
- Pudiera ser un buen predictor del desarrollo de LEG en grupos de alto riesgo como son los pacientes con SAFp.

IV. Correlación de los anticuerpos anti-nucleosoma con la actividad y
daño crónico en pacientes con lupus eritematoso generalizado.

Alumno: Jesús Abraham Simón Campos.

Sede: Departamento de Inmunología y Reumatología.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Tutor: Dr. Jorge Alcocer Varela.

Cotutor: Javier Cabiedes Contreras

1. Introducción: Estudios experimentales en el modelo murino de lupus han mostrado que la patogenicidad de los autoanticuerpos puede depender de su capacidad de formar complejos inmunes con el nucleosoma [20].

Debido a que el nucleosoma representa la unidad fundamental de organización del DNA [10,11], los anticuerpos capaces de reconocer antígenos del nucleosoma, han sido llamados como anticuerpos anti-cromatina.

Esta compleja familia de anticuerpos, esta formada por los anticuerpos anti-DNA de cadena doble (anti-DNAcd), los cuales reconocen las áreas de DNA no cubiertas por histonas; los anticuerpos anti-histonas (anti-HST) que reconocen las áreas de histonas no cubiertas por DNA; y un tercer grupo de anticuerpos que solo reconoce las áreas de superposición entre DNA/Histonas. Es decir solo reconocen la estructura cuaternaria del nucleosoma y no los elementos aislados que la constituyen (DNA e histonas) [5,6].

Puesto que estos anticuerpos pueden formar complejos inmunes con el nucleosoma, se ha planteado que pueden estar involucrados en la fisiopatología del lupus eritematoso generalizado (LEG), especialmente en el desarrollo de nefropatía [20].

Estudios preliminares han mostrado que los anticuerpos anti-cromatina, especialmente los anti-NCS pueden ser útiles en el diagnóstico del LEG y posiblemente como marcadores de la actividad [24].

Es por eso que el principal objetivo de este estudio, fue determinar la utilidad de los anticuerpos anti-cromatina como marcadores de actividad y daño en pacientes con LEG.

2. Material y Métodos: Estudio transversal en el cual incluimos pacientes con LEG (≥ 4 criterios del ACR)[30] atendidos en forma consecutiva entre Agosto - Octubre del 2002, en el departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Estos pacientes fueron evaluados por un Reumatólogo (ciego a los títulos de anticuerpos anti-cromatina) quien determinó el grado de actividad de la enfermedad a través de la escala Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) [31]. En la misma visita una muestra de 10ml de suero fue tomada y almacenada a -70°C para la determinación de 3 anticuerpos anti-cromatina (anti-DNAcd, anti-NCS y anti-histonas –anti-HST-).

a) Anticuerpos anti-cromatina: Los anticuerpos anti-cromatina fueron determinados a través de un ensayo inmunoenzimático (IEA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Orgentec Diagnostika GmbH). Las placas fueron leídas a 450 y 650 nm. La reproducibilidad fue evaluada con 8 controles positivos y 8 negativos ($r = 0.98$).

Los puntos de corte se establecieron con base a la $\mu \pm 2$ DE de los títulos encontrados en un grupo control de 123 sujetos sanos (anti-NCS: 60, anti-dsDNA:18 y anti-HST 87 U/ml). El investigador responsable de la realización de los anticuerpos anti-cromatina estuvo ciego a la condición clínica de los pacientes. El estudio fue aprobado por el comité de investigación biomédica del INCMNSZ.

b) Análisis estadístico: Las variables continuas fueron expresadas con medianas, intervalos y medias \pm desviación estándar. Las variables dicotómicas fueron expresadas con frecuencias y porcentajes. El análisis bivariado se realizó mediante la prueba de U Mann-Whitney para las variables continuas y la X^2 con corrección de Yates o exacta de Fisher para las variables dicotómicas. La comparación entre mas de dos grupos se realizó mediante ANOVA o su equivalente no paramétrico (Kruskal-Wallis). La correlación entre la actividad de la enfermedad y los títulos de anticuerpos anti-cromatina mediante la rho de Sperman. El valor significativo de p se estableció en ≤ 0.05 de dos colas. El tamaño de muestra se estimó utilizando la fórmula de correlaciones. Asumiendo una correlación mínima del 50% entre los títulos de anti-NCS y la actividad en pacientes con LEG, con un valor α 0.05 (dos colas) y un valor β de 0.05, se estimó una muestra de al menos 14 pacientes.

3. Resultados: Incluimos 75 pacientes con LEG (54 mujeres) (tabla 5) con edad media (\pm DE) de 32.3 ± 12.5 años (mediana 30, intervalo 15-68 años) y con tiempo de evolución del LEG de 58.9 ± 34.0 meses (mediana 34, intervalo 0-238). Al momento de su evaluación tuvieron un SLEDAI de 4.7 ± 5.8 (mediana 3.5, intervalo de 0-25).

Tabla 5. Características clínicas y demográficas de 75 pacientes con LEG .

Característica	media	DE	mediana	intervalo
Edad (años)	32.3	12.5	30	15-68
Tiempo de evolución del LEG (meses)	58.9	34.0	34	0-238
Criterios del LEG-ACR (número)	6.5	2.4	5	4-8
SLEDAI (puntuación)	4.7	5.8	3.5	0-25

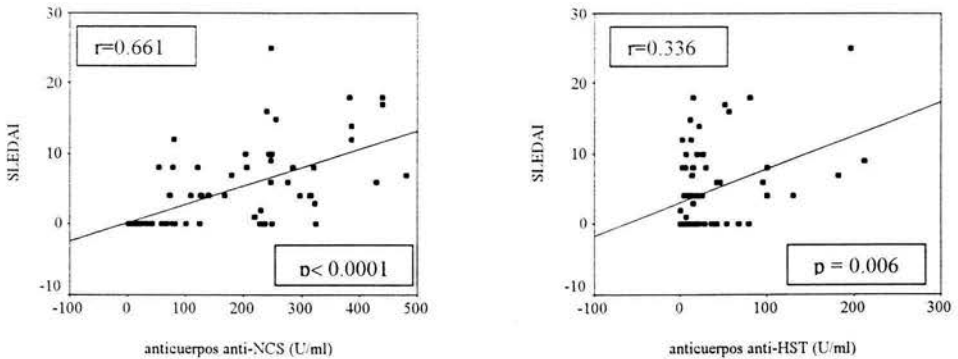
.DE: Desviación estándar. ACR: Colegio americano de reumatología.

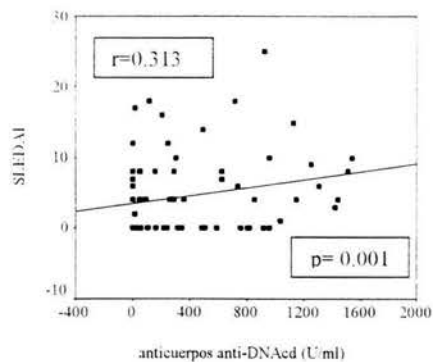
De los 75 pacientes incluidos, 30 pacientes estaban inactivos, 15 tuvieron un SLEDAI de 1 - 4, 18 de 5 a 10 y 12 con mas de 10 puntos. Las manifestaciones más frecuentes del LEG fueron las muco-cutáneas (60%), daño renal (53%), artritis (42%), fiebre y manifestaciones hematológicas (20%) y serositis (11%). Además el 63% tuvo niveles de complemento 3 y/o 4 disminuidos. Con relación a los anticuerpos anti-cromatina, el 9% fueron positivos para los anticuerpos anti-HST, el 68% para los anticuerpos anti-DNAcd y el 71% para los anticuerpos anti-NCS. La media (\pm DE) en los títulos

de anticuerpos anti-HST fue de 30 ± 44 U/ml (mediana 13, intervalo 0 - 211), la de los anti-DNAcd de 407 ± 466 (mediana $240 \pm 0 - 1540$) y la de los anti-NCS de 162 ± 132 U/ml (mediana 127, intervalo de 1 - 481).

a) Anticuerpos anti-cromatina y su correlación con la actividad: Todos los anticuerpos anti-cromatina tuvieron correlación con la actividad de la enfermedad, pero esta fue mayor con los anticuerpos anti-NCS ($r = 0.661$, $p < 0.0001$), que con los anticuerpos anti-DNAcd ($r = 0.313$, $p = 0.01$) y con los anticuerpos anti-HST ($r = 0.336$, $p = 0.006$) (figura 3).

Figura 3. Correlación de los anticuerpos anti-cromatina con la actividad del LEG





Por otro lado los anticuerpos anti-NCS tuvieron una fuerte asociación con la presencia de proteinuria (RM 12.4, IC95% 1.6 - 46.6, $p = 0.001$), hematuria (RM 4.0, IC95% 1.2 - 23.5, $p = 0.04$) y artritis (RM 7.5, IC95% 1.1 - 61.6, $p = 0.02$); mientras que los anticuerpos anti-HST tuvieron una fuerte asociación con artritis (RM 5.3, IC95% 1.1 - 27.1, $p = 0.05$), úlceras orales (RM 8.2, IC95% 1.4 - 47.7, $p = 0.02$) y trombocitopenia (RM 23.0, IC95% 1.8 - 307.0, $p = 0.02$). Los anticuerpos anti-DNAc solo tuvieron una asociación marginal con la presencia de proteinuria (RM 3.2, IC95% 0.8 - 12.5, $p = 0.07$)(tabla 6). De igual forma al comparar el grupo de pacientes con y sin nefropatía, encontramos que los títulos de anticuerpos anti-NCS fueron significativamente mas altos en el grupo con nefropatía (242.2 ± 121.2 vs. 141.6 ± 128.7 , $p = 0.003$). No encontramos diferencias en los títulos de anti-DNAc y anti-HST entre pacientes con y sin nefropatía.

Tabla 6. Asociación de los anticuerpos anti-cromatina con las manifestaciones del LEG.

Anticuerpos	Manifestación	RM	IC 95%	p*
<i>Anti-NCS</i>				
	Proteinuria	12.4	1.6 – 46.6	0.001
	Hematuria	4.0	1.2 – 23.5	0.04
	Artritis	7.5	1.1 – 61.6	0.02
Anti-HST				
	Artritis	5.3	1.1 – 27.1	0.05
	Úlceras orales	8.2	1.4 – 47.7	0.02
	Trombocitopenia	23.0	1.8 – 307.0	0.02
<i>Anti-DNAcd</i>				
	Proteinuria	3.2	0.8 – 12.5	0.07

* El valor de p se estimó mediante la chi cuadrada con corrección de Yates o Fisher exacta según correspondió.

b) Pacientes anti-DNAcd negativos. Debido a que existe un subgrupo de pacientes con LEG los cuales son negativos para los anti-DNAcd y debido a que en ellos no se cuenta con marcador de actividad, decidimos realizar un subanálisis en 24 pacientes (32%) con estas características. Los anticuerpos anti-NCS fueron los únicos que tuvieron una alta correlación con la actividad de la enfermedad ($r = 0.828$, $p < 0.0001$) (figura 4) y una fuerte asociación con artritis (RM 12.0, IC95% 1.2 - 46, $p = 0.01$), proteinuria (RM 7.2, IC95% 1.1 - 84.0, $p = 0.04$) y

fiebre (RM 7.2, IC95% 1.1 - 84.0, $p = 0.04$) (tabla 7). Los anticuerpos anti-HST no tuvieron correlación con la actividad global ni asociación con alguna de las manifestaciones del LEG.

Figura 4. Correlación de los anticuerpos anti-NCS en pacientes negativos para los anticuerpos anti-DNAcd.

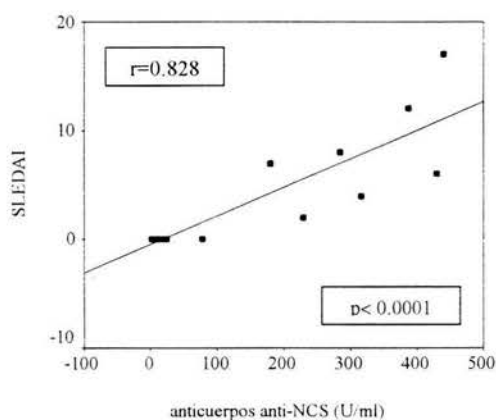


Tabla 7. Asociación de los anticuerpos anti-NCS con las manifestaciones del LEG, en pacientes negativos para los anticuerpos anti-DNAcd.

Anticuerpos	Manifestación	RM	IC 95%	p*
<i>Anti-NCS</i>				
	Artritis	12.0	1.2 - 46.0	0.01
	Proteinuria	7.2	1.1 - 84.0	0.04
	Fiebre	7.2	1.1 - 84.0	0.04

* El valor de p se estimó mediante la chi cuadrada con corrección de Yates o Fisher exacta según correspondió.

c) Pacientes anti-NCS negativos. Con el objeto de evaluar el impacto de los anticuerpos anti-DNAcd y anti-HST sobre la actividad de la enfermedad, en ausencia de los anticuerpos anti-NCS, realizamos un subanálisis en el cual incluimos 22 pacientes (29%) que fueron negativos para los anticuerpos anti-NCS. En ellos evaluamos la utilidad de los anticuerpos anti-DNAcd y anti-HST como marcador de actividad. Ambos anticuerpos tuvieron correlación positiva con la actividad del LEG, pero esta no fue estadísticamente significativa: anti-DNAcd ($r = 0.343$, $p = 0.16$), anti-HST ($r = 0.226$, $p = 0.31$). De igual forma estos anticuerpos no tuvieron asociación con las manifestaciones del LEG, en este subgrupo de pacientes.

d) Pacientes negativos para los anticuerpos anti-HST. Finalmente en sesenta y ocho pacientes (91%) quienes fueron negativos para los anticuerpos anti-HST evaluamos la correlación de los anti-NCS y anti-DNAcd con la actividad de la enfermedad. Encontramos que ambos anticuerpos tuvieron una alta correlación con la actividad de la enfermedad (figura 5), pero esta fue mayor con los anticuerpos anti-NCS ($r = 0.677$, $p < 0.0001$) que con los anti-DNAcd ($r = 0.265$, $p = 0.04$). De igual forma, los anticuerpos anti-NCS fueron los únicos que tuvieron una fuerte asociación con la presencia de proteinuria (RM 12.2, IC95% 1.3 - 84.4, $p = 0.001$) y una asociación marginal con artritis (RM 6.0,

IC95% 0.7 - 50.8, $p = 0.08$) y hematuria (RM 4.2, IC95% 0.8 - 64.3, $p = 0.09$) (tabla 8).

Figura 5. Correlación de los anticuerpos anti-cromatina con la actividad en pacientes con LEG negativos para los anticuerpos anti-HST

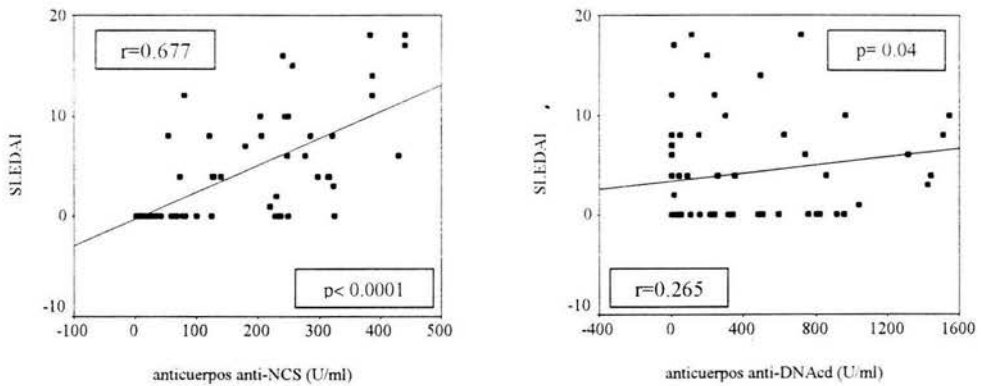


Tabla 8. Asociación de los anticuerpos anti-NCS con las manifestaciones del LEG, en pacientes negativos para los anticuerpos anti-HST.

Anticuerpos	Manifestación	RM	IC 95%	p*
<i>Anti-NCS</i>				
	Proteinuria	12.2	1.3 – 84.4	0.001
	Artritis	6.0	0.7 – 50.8	0.08
	Hematuria	4.2	0.8 – 64.3	0.09

* El valor de p se estimó mediante la chi cuadrada con corrección de Yates o Fisher exacta según correspondió.

e) *Interacción entre los anticuerpos anti-cromatina:* Debido a que los anticuerpos anti-cromatina tuvieron correlación entre sí (anti-NCS vs. anti-HST $r = 0.452$, anti-NCS vs. anti-DNAcD $r = 0.517$ y anti-HST vs. anti-DNAcD $r = 0.396$ $p < 0.0001$) decidimos evaluar si la presencia estos anticuerpos tiene un efecto aditivo sobre la actividad de la enfermedad. De los 75 pacientes incluidos en este estudio el 21% fue negativo para los tres anticuerpos, el 19% fue positivo para uno, el 38% para dos y solo el 7% fue positivo para los tres anticuerpos. Encontramos que el número de anticuerpos tuvo una correlación positiva con la actividad de la enfermedad ($r = 0.461$, $p < 0.0001$). Los pacientes negativos para los 3 anticuerpos tuvieron una media de SLEDAI de 0 ± 0 , los que fueron positivos para un anticuerpo de 4.57 ± 5.36 , los que fueron positivos para dos de 5.5 ± 5.8 y los que fueron positivos para los 3 de 9.5 ± 7.8 ($p = 0.001$). Con el objeto de confirmar el efecto aditivo de los anticuerpos anti-cromatina sobre la actividad de la enfermedad, realizamos un modelo de regresión lineal paso a paso, utilizando como variable dependiente la actividad global medida por el SLEDAI y como variables independientes los títulos de los tres anticuerpos anti-cromatina (anti-NCS, anti-HST y anti-DNAcD). Encontramos que la única variable que se mantuvo en el modelo fue los títulos de anticuerpos anti-NCS, tanto los anti-DNAcD, como los anti-HST fueron eliminados del modelo. (r^2 del modelo de 0.400 , $p < 0.0001$).

f) Anticuerpos anti-cromatina en pacientes con remisión del LEG. De los pacientes incluidos en este estudio 30 pacientes no tuvieron evidencia de actividad de la enfermedad. Al comparar las medias entre activos e inactivos, los títulos de los anticuerpos anti-cromatina fueron mayores en el grupo de activos: anti-NCS (247.3 ± 114.7 vs. 78.9 ± 93.8 , $p < 0.0001$), anti-HST (44.5 ± 56.5 vs. 18.4 ± 21.0 , $p = 0.01$), anti-DNAcd (557.8 ± 523.2 vs. 244.7 ± 323.7 , $p = 0.005$). De igual manera la ausencia de cualquiera de los anticuerpos anti-cromatina tuvo una fuerte asociación con la presencia de remisión (tabla 9), pero esta fue mayor con los anticuerpos anti-NCS (RM 45.0, IC95% 5.5 - 333.0, $p < 0.0001$), anti-HST (RM 6.0, IC95% 1.3 - 108.2, $p = 0.02$) y anti-DNAcd (RM 3.1, IC 95% 1.0 - 9.5, $p = 0.05$).

Tabla 9. Asociación de los anticuerpos anti-cromatina con remisión clínica en pacientes con LEG.

Anticuerpos	RM	IC 95%	p*
<i>Anti-NCS</i>	45.0	5.5 -333.0	0.0001
<i>Anti-HST</i>	6.0	1.3 - 108.2	0.02
<i>Anti-DNAcd</i>	3.1	1.0 -9.5	0.05

* El valor de p se estimó mediante la chi cuadrada con corrección de Yates o Fisher exacta según correspondió.

4. Discusión: Se ha planteado que el principal mecanismo de daño en pacientes con LEG es el depósito de inmunocomplejos [32]. Evidencias recientes sugieren que el nucleosoma representa el principal antígeno en el LEG [5-7] y que la patogenicidad de los autoanticuerpos en pacientes con LEG depende de su capacidad de formar complejos inmunes con esta estructura [20].

Los anticuerpos anti-cromatina representan una familia de anticuerpos que son capaces de reconocer diferentes segmentos de la estructura del nucleosoma [10,11]. Los anti-DNAcd reconocen las áreas de DNA no cubiertas por histonas, los anti-HST reconocen las áreas de histonas no cubiertas DNAcd y los anti-NCS reconocen exclusivamente las áreas de sobreposición entre histonas y DNAcd.

Estudios en el modelo murino de lupus han mostrado que los anticuerpos anti-cromatina participan en la fisiopatología del LEG, especialmente en la nefritis lúpica [20]. Es por eso que decidimos evaluar la utilidad de los anticuerpos anti-cromatina como marcador de actividad en pacientes con LEG

En el presente trabajo encontramos que los anticuerpos anti-NCS tienen una alta correlación con la actividad del LEG y una fuerte asociación con la presencia de daño renal. Los otros anticuerpos anti-cromatina (anti-DNAcd y anti-HST) si bien parecen tener un efecto aditivo sobre la actividad de esta enfermedad, su participación en el desarrollo de esta parece ser marginal. Es así, como al analizar los diferentes patrones de anticuerpos anti-cromatina pudimos demostrar que el elemento determinante en el desarrollo de la actividad es la

presencia de los anticuerpos anti-NCS. En ausencia de los anticuerpos anti-NCS, ni los anti-DNAcd, ni los anticuerpos anti-HST tuvieron correlación con la actividad de la enfermedad. Estos resultados confirman los hallazgos encontrados en estudios preliminares, en donde se mostró que en los pacientes con LEG de reciente inicio, además de haber una alta prevalencia de los anticuerpos anti-NCS, estos pueden tener una fuerte asociación con la actividad de la enfermedad [24]. Es importante resaltar que en el grupo de pacientes que fueron negativos para los anticuerpos anti-DNAcd, los anticuerpos anti-NCS también estuvieron fuertemente asociados con la actividad de la enfermedad, lo que resulta interesante si consideramos que en estos pacientes no se cuentan con un marcador útil de actividad de la enfermedad. La utilidad de los anticuerpos anti-NCS en pacientes negativos para anti-DNAcd, ha sido mostrada también en población asiática, en donde se encontraron resultados similares a los presentados aquí [33].

La alta utilidad de la medición de los anticuerpos anti-NCS como un marcador de actividad pudiera explicarse sobre la base misma de la determinación de estos anticuerpos. La prueba de anticuerpos anti-NCS utiliza como antígeno el nucleosoma. Si consideramos que la patogenicidad de los anticuerpos anticromatina depende de su capacidad de formar complejos antígeno-anticuerpo con el nucleosoma, es por lo tanto lógico pensar que independientemente de la región del nucleosoma que reconocen, sea DNA, histonas o las áreas de

sobreposición, esta prueba permitiría identificar anticuerpos patogénicos verdaderos. Es así, que desde nuestra perspectiva los anticuerpos anti-DNA y los anti-HST, no son otra cosa mas que un subgrupo de anticuerpos anti-NCS.

La asociación positiva de los anti-NCS con el daño renal ha sido demostrada previamente tanto en el modelo murino como en pacientes con LEG [5,-7,14,20,24-28], y esta parece depender de una compleja interacción de cargas entre la estructura cuaternaria del nucleosoma y los epítopes blanco a nivel renal. Es así, como las histonas del nucleosoma las cuales están cargadas catiónicamente tienen interacción con la membrana basal glomerular (MBG), la cual tiene carga contraria, lo que permite el depósito de los complejos inmunes a este nivel.

El papel patogénico de los complejos anti-cromatina/nucleosoma ha sido demostrado en el modelo murino. Van Brugen *et al* [20] realizaron un estudio en ratones BALB/c, a los cuales inocularon con 3 diferentes hibridomas, productores de anti-DNA, anti-HST y anti-NCS. Ellos encontraron que los 3 anticuerpos anti-cromatina son capaces de formar complejos antígeno-anticuerpo con el nucleosoma y además estos complejos son capaces de depositarse a diferentes niveles de la MBG, generando de esta manera glomerulonefritis en casi todos los ratones estudiados. Por otro lado determinaron si la unión de los anticuerpos anti-cromatina a la MBG fue independiente de la formación de complejos con el nucleosoma. Para esto utilizaron un subrogado de la MBG

conocido como matrigel. Con este ensayo ellos demostraron que los anticuerpos purificados no se unen a la MBG, mientras que los complejos anti-cromatina/nucleosoma si lo hacen. Es importante decir que estos experimentos también fueron llevados a cabo con otros antígenos nucleares como son el DNA y las histonas y los resultados no pudieron reproducirse, lo cual plantea la importancia del antígeno nucleosoma en la génesis del daño renal.

Otra aportación relevante de este trabajo, es el papel que puede tener la negativización de los anticuerpos anti-NCS como predictor de remisión en pacientes con LEG. Hasta donde conocemos la utilización de los anticuerpos anti-NCS como predictor de remisión clínica en pacientes con LEG no ha sido explorada previamente, pero es lógico suponer que si existe una fuerte asociación entre la presencia de los anticuerpos anti-NCS y la actividad de LEG, lo inverso también podría ser cierto.

Debemos reconocer algunas limitaciones de este trabajo, como lo es la naturaleza transversal de la determinación de los anticuerpos anti-NCS, lo que no permitió determinar su sensibilidad al cambio. A pesar de esta limitación podemos concluir que los anticuerpos anti-NCS tienen una alta correlación con la actividad del LEG y una fuerte asociación con la presencia de daño renal, por lo cual podrían ser utilizados como un marcador de actividad en pacientes con LEG.

5. Bibliografia.

1. Hannahs B. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998;19:1359-1368.
2. Pisetsky DS. Anti-DNA and autoantibodies. *Cur Opin Rheumatol* 2000;12:364-368.
3. Villarreal GM, Drenkard C, Villa AR, et al. Prevalence of 13 autoantibodies and of the 16/6 and related pathogenic idiotypes in 465 patients with systemic lupus erythematosus and their relationship with disease activity. *Lupus* 1997;6:425-435.
4. Fritzler MJ, Salazar M. Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:256-69.
5. Amoura Z, Piette JC, Bach JF, et al. The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum* 1999;42:833-43.
6. Amoura Z, Piette JC, Bach JF, et al. The key role of nucleosomes in lupus. *Cur Opin Rheumatol* 2000;12:369-373.

7. Lefkowitz JB, Gilkenson GS. Nephritogenic autoantibodies in lupus. *Arthritis Rheum* 1996;39:894-903.
8. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2000;43:76-84
9. Bruns A, Blass S, Hausdorf G, et al. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43:2307-2315.
10. Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, et al. Structure of nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 1984;311:532-537.
11. Luger K. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389:251-260.
12. Shlomchik MJ, Mascelli H, Shan MZ, et al. Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arises by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med* 1990;171:265-70.

13. Tsao BP, Ebling FM, Roman C, et al. Structural characteristics of the variable regions of immunoglobulin genes encoding a pathogenic autoantibody in murine lupus. *J Clin Invest* 1990, 85:530
14. Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 1993;177:1367-81.
15. Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, et al. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp *lpr/lpr* and *+/+* mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 1994;37:1684-8.
16. Chabre H, Amoura Z, Piette JC, et al. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1485-91.
17. Casciola Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994;179:1317-30.

18. Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994;152:3685-92.
19. Amoura Z, Piette JC, Chabre H, et al. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:2217-25.
20. Van Bruggen M, Walgreen B, Rijke T, Tamboer W, Kramers K, Smeenk R, et al. Antigen specificity of anti-nuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo. *Eur J Immunol* 1997;27:1564-69.
21. Laderach D, Bach JF, Koutouzov S. Nucleosomes inhibit phagocytosis of apoptotic thymocytes by peripheral macrophages from MRL +/+ lupus-prone mice. *J Leukoc Biol* 1998;64:774-780.
22. Bell DA, Morrison B, Vandenbygaart P, et al. Immunogenic DNA-related factors: nucleosomes spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes. *J Clin Invest* 1990;85:1478-96.

23. Simón JA, Cabiedes J, Sánchez-Guerrero J. et al. Prevalencia de los anticuerpos anti-nucleosoma en las enfermedades del tejido conectivo. *Rev Mex Reumatol* 2002;17:65

24. Simón JA, Cabiedes J, Ortiz E, et al. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent-onset. Potential utility as diagnostic and disease activity marker. *Rheumatology* 2004 in press.

25. Simón JA, Cabiedes J, Alcocer-Varela J. Correlación de los anticuerpos anti-cromatina con la actividad clínica de pacientes con lupus eritematoso generalizado. *Rev Mex Reum* 2003;18:7.

Simón JA, Cabiedes J, Pascal G, et al. Anti-chromatin antibodies and nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus. *Case control study. Arthritis Rheum* 2003.

27. Simón JA, Cabiedes J, Alcocer-Varela J. Anticuerpos anti-nucleosoma como marcador de actividad en pacientes con lupus eritematoso generalizado negativos para los anticuerpos anti-DNAcc. *Rev Mex Reum* 2003;18:58.

28. Simón JA, Cabiedes J, Pascal G, Musset L, Amoura Z. Utilidad de los anticuerpos anti-cromatina en el seguimiento de los pacientes con lupus eritematoso generalizado. Estudio longitudinal. *Rev Mex Reum* 2004.
29. Simón JA, Rojas-Serrano J, Cabiedes J, Alcocer-Varela J, Alarcón-Sagovia D. Anti-nucleosome antibodies may help predict systemic lupus erythematosus development in patients with primary antiphospholipid syndrome. (*LUPUS 2004 in press*).
30. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
31. Bombardier C, Gladman D, Urowitz M, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity Index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35:630-640.
32. Mason LJ, Isenberg DA. Immunopathogenesis of SLE. *Baill Clin Rheum* 1998;12:385.

33. Min DJ, Kim SJ, Park SH, et al. Anti-nucleosome antibody: Significance in lupus patients lacking anti-double-stranded DNA antibody. *Clin Exp Rheum* 2002;20:13-18.