

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ANTICUERPOS ANTI-NUCLEOHISTONAS Y SU
RELACION CON ANTICUERPOS
ANTI - TOPOISOMERASA - I EN
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

AIDA NAVAS PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. MÉD. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO

MEXICO, D. F.

ABRIL, 2004



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**

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

PRESIDENTE : DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
VOCAL : M.EN C. MÉD. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO
SECRETARIO : DR.FERNANDO GARCÍA TAMAYO
SUPLENTE : DRA. LAILA GUTÉRRERZ KOBE
SUPLENTE : DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER)

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MÉD. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas aquellas personas que contribuyeron y apoyaron a la culminación de esta Tesis, principalmente:

A mis Admirables Padres: Joel y Consuelo⁺, por sus consejos y ejemplos.

A mis entusiastas hermanos y sus esposas: Heriberto y Carmen. Joel e Irma.

A mis queridos sobrinos: Joselyn, Jéssica, Carolina, Estefania, Marisol y Alberto.

A la memoria de mis ejemplares abuelos y padrinos: Carmen⁺, Clementina⁺, Heriberto⁺, Leon⁺ y Leonor⁺.

Con respeto y profundo agradecimiento. A mi Maravilloso y Sabio Jurado:

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Erasmo Martínez Cordero

Dr. Fernando García Tamayo

Dra. Laila Gutiérrez Kobe

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

A mis exelentes amigas: Juanita González, Delia Franco, Edith Rangel, y Amelia Martínez.

A los investigadores del INER y INCMNSZ por su valiosa desinteresada e incondicional ayuda:

Dr. Guillermo Carbajal Sandoval

Dr Luis Alberto Martínez Rossier

Dr. Erasmo Martínez Cordero

Dr. Luis Maldonado Noriega

Q.F.B. Juana Arellano García

Dr. José Luis Rosano Pérez

M.I.B.B. Diana Elodía Aguilar León*

Dr. José Arturo Zambrano Gordo

*En particular por participar en la co-asesoría del trabajo

INDICE GENERAL

GLOSARIO DE TERMINOS	5
RESUMEN	6
ANTECEDENTES	9
<i>Lupus eritematoso generalizado</i>	
<i>Estructura nuclear</i>	
<i>Anticuerpos antinucleares</i>	
<i>Histonas y anticuerpos contra nucleohistonas</i>	
<i>Topoisomerasa-I y anticuerpos contra esta proteína</i>	
<i>Relación de los AANH y anticuerpos contra Topo-I</i>	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS	23
<i>Pacientes</i>	
<i>Anticuerpos antinucleares por Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</i>	
<i>Anticuerpos anti-DNA nativo (DNAn)</i>	
<i>Anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA)</i>	
<i>Anticuerpos contra nucleohistonas por ELISA</i>	
<i>Anticuerpos contra Topoisomerasa-I por ELISA</i>	
<i>Anticuerpos por inmunoelectrotransferencia</i>	
<i>Evaluación del reconocimiento de epítopes compartidos</i>	
<i>Análisis de los resultados</i>	
RESULTADOS	28
<i>Anticuerpos antinucleares por IFI en los pacientes con LEG</i>	
<i>El suero de pacientes con LEG tienen AANH y anticuerpos anti-Topo-I</i>	
<i>Identificación de anticuerpos mediante inmunoelectrotransferencia</i>	
<i>Ensayo de inhibición</i>	
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40
ANEXOS	46

GLOSARIO DE TERMINOS

AANH: Anticuerpos anti-nucleohistonas.

ACR: Colegio Americano de Reumatología.

ADP: adenosildifosfato

Arg: Arginina

Asp: Asparagina

DNA: Acido desoxirribonucleico.

DNA_n: DNA nativo

ELISA: Análisis inmunoenzimático

E. coli: Escherichia coli

FR: Factor reumatoide

Gly: Glicina

Glu: Glutamina

H1: Nucleohistona-1

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

Kda: Kilodaltons

LE: Lupus eritematoso

LEG: Lupus eritematoso generalizado

Lys: Lisina

RNA: Acido ribonucleico

RNP_n: Ribonucleoproteína nuclear

Sm: Antígeno nuclear "Smith"

SSA(Ro): Antígeno que es reconocido por autoanticuerpos

SSB(La): Antígeno que es reconocido por autoanticuerpos

Topo-I: DNA Topoisomerasa-I

Topo Ir: topoisomerasa-I recombinante

Tyr: Tirosina

VDRL: Prueba serológica para sífilis

Zn: Zinc

RESUMEN

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune con características clínicas y de laboratorio heterogeneas. Entre la variedad de anticuerpos dirigidos contra distintos componentes nucleares, destacan los anticuerpos anti-DNA, anti-Sm, anti-SSA(Ro), anti-SSB(La), anti-RNPn y anti-nucleohistonas (AANH) los cuales han sido considerados como marcadores importantes de la enfermedad. La interacción "in vivo" de algunos de estos componentes subcelulares puede explicar la inducción de anticuerpos polirreactivos independientes, o con reacción cruzada. El estudio de anticuerpos anti-topoisomerasa-I (Topo-I) en LEG ha recibido poco interés o ha sido reportado con baja frecuencia. Además su coincidencia con otro tipo de anticuerpos, en especial con los AANH, no se ha explorado previamente.

El objetivo de este trabajo fué estudiar con que frecuencia se pueden encontrar AANH y anti-Topo-I de manera simultánea en el LEG, así como caracterizar la posible reacción cruzada a dichos antígenos.

Se estudiaron 65 pacientes con LEG y 40 sueros de donadores sanos. Los anticuerpos antinucleares se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA e inmunoelectrotransferencia. El reconocimiento de nucleohistonas se evaluó usando un antígeno comercial purificado y la reactividad contra Topo-I se estudió mediante una fuente recombinante de este antígeno. Para analizar la unión de los anticuerpos antinucleares a epítopes compartidos en nucleohistonas y Topo-I se realizó mediante un ensayo de inhibición.

Sesenta y uno de los 65 sueros de los pacientes con LEG presentaron anticuerpos antinucleares positivos por IFI, apreciando un predominio de los patrones moteado, homogéneo y lineal periférico. El 20.0 % de los sueros presentaron AANH y anticuerpos anti-Topo-I de manera simultánea. Al realizar la prueba de inhibición, se observó que la incubación con nucleohistonas afectó los niveles de los anticuerpos correspondientes (AANH) y el uso de Topo-I modificó únicamente los valores de las inmunoglobulinas con esta especificidad.

La polirreactividad inmunológica que caracteriza al LEG explica la presencia simultánea de varios autoanticuerpos, incluyendo los AANH y anti-Topo-I. Es poco

probable que si los anticuerpos se generaran originalmente por un complejo antigénico de nucleohistonas y Topo-I se encontrara una clara separación de la inmunoreactividad en los sueros con AANH y anti-Topo-I. El estudio competitivo con antígenos purificados permite sustentar que estas inmunoglobulinas reaccionan específicamente con los epítopes de cada sistema antigénico.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease in which a wide array of clinical and laboratory abnormalities have been described. Among the different autoantibodies reported in SLE those directed against nuclear components such as anti-DNA, Sm, SSA(Ro), SSB(La), RNP and anti-nucleohistone antibodies (AANH) are the most important hallmarks of the disease. The "in vivo" interaction between some subcellular compounds may also explain the presence of polyreactive antibodies against different nuclear antigens, or a cross reactivity against similar nuclear targets. The study of anti-topoisomerase-I (Topo-I) antibodies has received scarce attention, or has been subject of only few analyses.

The aim of the present study was to analyze the frequency of the simultaneous presence of anti-histone and anti-Topo-I antibodies in SLE patients, and define whether a cross-reaction may explain these serological abnormalities.

Sixty five SLE patients and 40 healthy controls were studied. Antinuclear antibodies were detected by indirect immunofluorescence (IFI), ELISA and western blot. To detect the specific binding against histone a purified commercial source of this antigen was used. Anti-Topo-I antibodies were studied using a recombinant antigen. A competitive assay was used to demonstrate the specific epitope binding of anti-histone and anti-Topo-I antibodies.

Sixty one of the 65 sera showed positive antinuclear antibodies tests by IFI. Speckled, homogenous and peripheral patterns were the most prominent findings. Twenty percent showed the simultaneous presence of anti-histone and anti-Topo-I antibodies. The inhibition assay using histones or Topo-I did not show a cross-reactivity of the respective antibodies.

A polyreactivity in SLE may explain the presence of simultaneous autoantibodies, including those with anti-histone and anti-Topo-I reactivities. The production of antibodies was probably not related with an antigenic complex formed by histone and Topo-I.

ANTECEDENTES

Lupus eritematoso generalizado

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es uno de los prototipos de los trastornos autoinmunes que afecta el organismo en forma amplia y diversa. Su incidencia anual se ha estimado entre el 0.001 y 0.002% y la prevalencia es del 0.008%, mientras que algunos estudios reportan un caso por cada 7000 habitantes. La enfermedad tiene predilección por la raza negra, afectando principalmente a las mujeres con una relación de 4:1, hasta extremos de 9 a 15:1 y predomina entre los 15 a 40 años de edad (1).

Las pacientes pueden presentar gran variación en sus manifestaciones clínicas y pueden existir casos prácticamente asintomáticos mostrando alteraciones serológicas aisladas, o el compromiso de uno o varios órganos en forma única. Sin embargo, parece ser que la forma más común de presentación es aquella con manifestaciones generalizadas.

Los cambios clínicos más frecuentes del lupus son las alteraciones mucocutáneas, articulares, el fenómeno de Raynaud, y los cambios hematológicos, pero las de mayor importancia en el pronóstico general son el daño renal, y las alteraciones neurológicas, cardíacas y pulmonares (6,7,8,9).

Algunos estudios de laboratorio, permiten distinguir a esta enfermedad, especialmente durante la fase de exacerbación, pudiendo apreciar anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia y trombocitopenia. La proteinuria, con hematuria y la presencia de cilindros pueden ser evidencias de daño renal. De los estudios inmunológicos más útiles, destacan la hipergamaglobulinemia y las células LE positivas, sin embargo, los anticuerpos antinucleares han desplazado la realización de la prueba de las células LE, debido a su alta sensibilidad encontrándose positivos hasta en el 95% de los casos (10,11).

Estructura nuclear

El núcleo celular es un organelo distintivo de las células eucarióticas que participa en la transcripción del ácido desoxirribonucleíco (DNA), el procesamiento intranuclear de los ácidos ribonucleícos (RNA) hasta su total maduración y síntesis

de proteínas, así como en la duplicación del DNA y las relaciones con el citoplasma. Este organelo se caracteriza por tener varios territorios o dominios cuya estructura dinámica permite un intercambio rápido de los componentes nucleares de estos dominios y el nucleoplasma. Los principales territorios del núcleo son:

1.- Envoltura Nuclear (EN) ó cisterna perinuclear. Es el rasgo característico que diferencia a las células eucarióticas de la procarióticas, está formada por 2 membranas concéntricas separadas por un espacio perinuclear. La EN tiene 5 componentes: a) Membrana nuclear externa (MNE), b) Membrana nuclear interna (MNI); c) Cisternas perinucleares (Cp) que encierran a las anteriores, d) Complejo de poro (CP) y e) Lamina (L), red fibrilar proteica que está unida fuertemente al CP y a la cara nucleoplasmática de la MNI. La membrana externa está contigua al retículo endoplásmico rugoso y está frecuentemente llena de ribosomas. La función de la EN es aislar los procesos genéticos centrales de replicación del DNA y de síntesis de RNA respecto a los ribosomas citoplasmáticos, en los que el mensaje genético se traduce a proteínas (2,3,4,5).

2.- Poros Nucleares (PN). Estas estructuras perforan a la envoltura nuclear y a través de ellos se produce el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma (3).

3.-Matriz Nuclear (MN). Descrita también como una red fibrogranular de soporte estructural dinámico está compuesta de proteínas llamadas: a) Matrinas (de estructuras fibro-granulares, red interna, matriz interna), y b) Lamina-complejo de poro, constituida por restos nucleolares y RNA con funciones relacionadas al genoma siendo un sitio de organización de la replicación transcripción y del proceso postranscripcional. La Matriz Nuclear Interna contiene proteínas que se unen al RNA mensajero y pre-mensajero, así como a los RNAs de bajo peso molecular ricos en uracilo y también a restos de dichos RNAs (2,3,4,5). También aparecen en las Matrizes Nucleares Internas, de varios tipos de eucariontes enzimas denominadas genéricamente isomerasas, cuya función es catalizar cambios de conformación del DNA, la transcripción no nucleolar y el procesamiento postranscripcional del pre-mRNA, también se encuentra una

proteína de 95 kDa que reconoce secuencias de bases específicas en el DNA llamada secuencia MAR (matrix attachments regions, regiones de unión a la matriz) (4).

4.-Nucleoplasma (N). Es el medio interno del núcleo donde se encuentran distintos componentes como: a) Los gems (gemini de cuerpos de Cajal), los cuales son coincidentes con ó adyacentes a los cuerpos de Cajal, dependiendo de la célula examinada, y se han caracterizado por la presencia de los componentes SMN (cuyo nombre deriva de neuronas motoras sobrevivientes) y un factor asociado denominado Gemin 2, b) Los Cuerpos de Escisión, estructuras que coinciden o están localizadas de forma adyacente a los cuerpos de Cajal. Un subconjunto de Cuerpos de Escisión que no se traslapan con los cuerpos de Cajal contienen RNA recién sintetizado (2,3,4).

5.- Lamina Nuclear (LN). Se encuentra en la superficie interna de la EN, ayuda a determinar la forma del núcleo, es de origen proteico y existen 3 formas en los mamíferos (A,B,C). La Lamina está interrumpida por una red fibrosa en la zona de los poros nucleares permitiendo la entrada y salida de macromoléculas del núcleo. Su función es estabilizar mecánicamente al núcleo celular y participar en la replicación del DNA, en la organización de la cromatina, así como en el arreglo espacial de los complejos del poro nuclear, en el crecimiento nuclear y en el anclaje de las proteínas de la EN. Son altamente conservadas a través de la evolución y presentan interacciones con otros componentes nucleares durante la interfase y la mitosis. Recientemente se ha encontrado que la Lamina A está presente en los grupos que contienen componentes del splicing, es decir, en los cúmulos de gránulos intercromatinianos.

6.- Cromatina (C). Constituida por DNA cromosómico, histonas, una pequeña cantidad de proteínas ácidas no histonas, así como una cantidad pequeña de RNA. Aparece durante la interfase, pero en cuanto la célula entra en división la cromatina se organiza en estructuras individuales. Hay dos tipos de cromatina: la heterocromatina y la eucromatina y dos formas distintas de ésta, cromatina compacta que se agrupa en forma cromosómica y cromatina laxa que se dispone en subcompartimentos funcionales. A los paquetes de cromatina muy compactada

se les denomina Cromosomas, los cuales están organizados formando territorios dentro del nucleoplasma. Se ha considerado que los genes activos residen a lo largo de la superficie de las regiones holgadamente empaçadas. Por otra parte se ha observado que los cuerpos PcG (containing polycomb group), como los RING1, BMI1 y hPc2, están asociados a la heterocromatina pericentromérica. Actualmente no está claro si estos territorios son compartimentos de almacenamiento o están directamente involucrados en un mecanismo de ocultamiento ó aislamiento de los componentes de la cromatina (2,3,4,5).

7.- Nucleólo (N). Es un componente que puede ocupar hasta un 25% del volumen del núcleo. Se encuentra rodeado por cromatina perinucleolar (compacta). Las células de mamíferos pueden contener de 1 a 5 nucleólos. A diferencia de los organelos citoplasmáticos carece de membrana que lo delimite, aunque parece estar constituido por una estructura en forma de red. El tamaño del nucleólo refleja su actividad y por esto su número y tamaño varían notablemente en distintos tipos celulares. Es considerado el componente ribonucleoproteico más complejo y altamente ordenado en los eucariontes. En el nucleólo se encuentran contenidas proteínas nucleolares no histónicas como son: RNA polimerasa I, C23, B23, fibrilarina AG-NOR y factor UBF. Sus funciones son la síntesis y procesamiento del pre-rRNA y el ensamblaje de partículas pre-ribosómicas. En el nucleólo se pueden identificar claramente tres regiones: a) Los centros fibrilares, que parecen ser el equivalente interfásico de las regiones de organización nuclear (NORs) de cromosomas, b) El compartimento perinucleolar (PNC), y c) El cuerpo nuclear Sam68 que ha sido identificado como una estructura única asociadas con la superficie del nucleólo y parece tener un papel en el metabolismo del RNA (2,3,4,5). Aunque las funciones del PNC y los cuerpos nucleares Sam68 son desconocidas, ambas estructuras son encontradas predominantemente en células cancerígenas y raramente observadas en células primarias (2).

8.-Partículas Ribonucleicas no nucleolares (PRnn). Estas partículas que no forman parte del nucleólo están relacionadas principalmente con el mRNA y su procesamiento, desde su transcripción hasta el splicing, mecanismo gracias al cual los mRNA están listos para ser exportados al citoplasma y traducirse en

proteínas. Estos componentes ribonucleoproteicos involucran principalmente 4 estructuras: a) Gránulos pericromatinianos (GP), los cuales se encuentran en todos los núcleos celulares interfásicos y se localizan cercanos a los conglomerados de cromatina compacta, b) Gránulos intercromatinianos (GIC), que son estructuras ribonucleoproteicas con un RNA ribosomal bien protegido de la degradación al inicio del ciclo celular. Las partículas ribonucleicas se pueden encontrar como cúmulos distribuidos irregularmente y se les localiza en el espacio intercromatiniano, son de forma irregular y están unidos entre sí por pequeñas fibras. Respecto al significado citofisiológico de estos gránulos se sabe que el núcleo contiene muchos tipos de pequeñas moléculas de RNA con menos de 300 nucleótidos que se denominan snRNAs ("small nuclear RNAs") (U1,U2,U4, U5, U6) y que todas ellas están implicadas en el procesamiento de los precursores de mRNA y se asocian con proteínas específicas para formar complejos llamados (snRNPs) ("small nuclear ribonucleoprotein particles). Los spliceosomas son grandes complejos dinámicos (60S) que constan de snRNPs además de precursores de RNAm. Es interesante señalar que el papel clave de los snRNP (empalme o soldadura) se reveló gracias al estudio de anticuerpos específicos obtenidos de pacientes con LEG. Los GIC pueden estar involucrados en el almacenamiento y/o ensamblaje del spliceosoma y en la regulación del envío y/o coordinación del transporte de todos los RNA nucleares; c) Fibras pericromatinianas (FP) (3,4). Estos componentes se localizan en la periferia de la cromatina compacta como pestañas contrastadas e irregulares, son ricas en RNA y se caracterizan por la expresión morfológica de los transcritos nacientes, así como la estructura sobre las cuales ocurre el splicing de los pre-mRNA, d) Cuerpos Espiralados (CE), actualmente denominados Cuerpos de Cajal (CC). Son estructuras altamente conservadas y se encuentran asociados a los factores splicing pre-mRNA. Se encuentran cercanos al nucleólo, son generalmente esféricos y están formados por estructuras granulares y fibras espiraladas. En ocasiones pueden no estar asociados con el nucleólo y encontrarse libres en el nucleoplasma. El avance en el estudio de los cuerpos espiralados derivó de la identificación de sueros de pacientes con autoinmunidad. Los autoanticuerpos han

permitido identificar a la coilina p80, proteína de 80kd con una gran cantidad de residuos fosforilados y la fibrilarina, que es preferentemente nucleolar. Otra característica de los CE es que contienen factores de splicing (snRNP). Esto último se estudió mediante microscopía electrónica usando un anticuerpo llamado anti-Sm, que reconoce algunas proteínas comunes a todas los snRNP. Al utilizar anticuerpos específicos para cada snRNP, se detectó la presencia de U1, U2, U4, U6 y U5 por técnicas de inmunofluorescencia y se ha propuesto que los cuerpos espiralados pueden constituir sitios de transcripción y maduración de snRNA. Se ha considerado que estos componentes juegan un papel en la biogénesis de snRNP y en el tráfico de snRNPs y snoRNPs. En este territorio se localizan también los splicesomas U1, U2, U4, U6 y snRNP U5, así como del snRNP U7 y snoRNP U3 y U8 (2,3,4).

En el núcleo también se encuentran otras proteínas, enzimas y polipartículas, como el caso de las Topoisomerasas (I, II), DNA polimerasas, DNA helicasa, RNA primasa, DNA ligasa y las RNA polimerasas (I, II, III). Dentro de las proteínas cromosómicas no-histónicas encontramos al "grupo de alta movilidad" o proteínas HMG, llamadas así porque son relativamente pequeñas y con carga positiva. Otra proteína es el factor de transcripción 5S cuya función es unir secuencias específicas de DNA para iniciar la síntesis de un pequeño RNA ribosómico el RNA 5S. Las Polipartículas ó Informóferos son estructuras fibro-granulares en forma de sarta de cuentas iguales a las encontradas en fracciones nucleares que se han encontrado en núcleos purificados y presentan un coeficiente de sedimentación 30S. Los Spliceosomas son gránulos de más de 35nm de diámetro en la base de las asas que se extienden a un lado de la fibra principal y corresponden a los conjuntos de proteínas y RNAs de bajo peso siendo moléculas que intervienen en el proceso de eliminación de intrones y empalme de los exones, lo que corrobora que gran parte del splicing es cotranscripcional (2,3). También se ha reportado que los cuerpos denominados dominios oncogénicos PML, ND10, PODs y cuerpos Kr , así como las proteínas Sp100, SUMO1, HAUSP y CBP algunos de los cuales parecen tener un papel en aspectos de regulación transcripcional y

pueden ser blancos de infección viral ya que pueden conformar territorios nucleares diferentes.

Finalmente algunos territorios son específicos del tipo de célula o el estado fisiológico de ésta: a) cuerpos nucleares GATA 1 que contiene factores de transcripción GATA, y están presentes en células hematopoyéticas murinas, b) Foci HSF1 que define al factor de transcripción del choque térmico factor 1, y han sido descritos en el núcleo de células sometidas a choque térmico (2).

Anticuerpos antinucleares.

El suero de los pacientes con LEG contiene una variedad de anticuerpos dirigidos contra distintos componentes celulares que incluye la reactividad contra diversos antígenos nucleares. Entre ellos destacan por su frecuencia e importancia los anticuerpos anti-DNA, anti-Sm, anti-SSA (Ro), anti-SSB(La), anti-RNP, y anti-nucleohistonas (AANH) (10,11,12,13).

La detección de los autoanticuerpos y particularmente de anticuerpos anti-DNA nativo y Sm ha resultado muy útil en el estudio del LEG y parcialmente en la definición de subgrupos clínicamente diferentes. Su elevada sensibilidad o especificidad en esta enfermedad, en conjunto con el estudio de otros marcadores como los anticuerpos antifosfolípidos, así como el descenso del complemento son datos importantes para el diagnóstico diferencial y seguimiento (13). Otros estudios como el VDRL y el factor reumatoide (FR) se encuentran alterados en menor porcentaje.

Desde la descripción de los autoanticuerpos asociados con el lupus, se han intentado encontrar marcadores serológicos que definan la presencia de diferentes tipos de lesión tisular. Los anticuerpos anti-Sm y anti-SSA (Ro) se han asociado con alteraciones en sistema nervioso central y en algunos trabajos con neumopatía. Algunos estudios han mostrado la asociación de anticuerpos anti-Sm, antinúcleoproteínas, y anticuerpos dirigidos contra histonas en pacientes con trastornos respiratorios (10,11,12). Se ha reportado que mediante el método de contrainmunolectroforesis es posible detectar la incidencia y la significancia

clínica de anticuerpos anti-ENA en el LEG (14), pero actualmente el método que más se utiliza es el ELISA.

Los autoanticuerpos pueden explicar en algunos pacientes con LEG los cambios patológicos de esta enfermedad. En algunos casos, predomina claramente una lesión mediada por complejos inmunes con la participación de anticuerpos anti-DNA nativo y lesión renal (15), mientras que en otros pacientes con anticuerpos anti-Sm se pueden encontrar otras manifestaciones clínicas, como algunos procesos linfoproliferativos benignos con manifestaciones prominentes en sistema fagocítico mononuclear. Además, algunas evidencias recientes sugieren que la detección de anticuerpos anti-DNA nativo o Sm permite definir grupos de pacientes mutuamente excluyentes (12).

Histonas y anticuerpos contra nucleohistonas

Las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) son proteínas policatiónicas altamente conservadas que se unen a la doble hélice del DNA eucariótico formando una estructura compleja junto con las proteínas no-histonas. Una característica importante de las histonas, es su elevado contenido de cadenas laterales cargadas positivamente (aproximadamente uno de cada cuatro aminoácidos que las componen es lisina o arginina). Tanto el DNA como las histonas forman los elementos estructurales denominados nucleosomas que tienen algunas funciones esenciales como la regulación de la capacidad del DNA para la replicación y la transcripción mediante modificaciones covalentes tales como la modulación de carga y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno. Cada tipo de histona puede tener varias formas distintas debido a modificaciones post-traduccionales en determinadas cadenas laterales de los aminoácidos. Además, cabe hacer notar que las histonas pueden estar acetiladas, como es el caso de la lisina 16 de la H4, o bien metiladas, ADP-ribosiladas y fosforiladas. Uno de los aspectos más interesantes de las histonas es que pueden ser expulsadas de las células a la circulación durante el proceso de apoptosis y durante esta fase puede cambiar su interacción con otros componentes nucleares (15,17).

Debido a su naturaleza proteica y a que reúnen las características de ser potencialmente antigénicas, las histonas son capaces de formar anticuerpos. Estos fueron detectados por primera vez en 1960 por Kunkel (16). El estudio respecto a estos cambios inmunes fueron realizados en sueros de pacientes con LEG empleando la técnica de fijación del complemento. Estos hallazgos fueron confirmados en 1971 por Stollar (15) quién empleó la misma técnica. En 1976 Tan y colaboradores (19) describen el mismo fenómeno empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En 1978 Fishbein y colaboradores (20) hacen una correlación entre las dos técnicas y demuestran la presencia de anticuerpos de histonas en 11 de 45 pacientes con LEG sin tratamiento médico. Más adelante Fritzler y Tan (21) usando inmunofluorescencia encontraron una alta incidencia de anticuerpos contra histonas en pacientes con lupus inducido (93% de 23 pacientes estudiados) comparado con una baja incidencia (35%) en LEG idiopático (22,24,25). Otros trabajos han descrito que los anticuerpos anti-histona de la clase IgG ocurren en el suero de más del 50% de pacientes con LEG idiopático y en más del 90% de pacientes con lupus inducidos por drogas (21,24,25,26,31).

De acuerdo a algunos autores (15,22,27,69) las histonas libres o en forma de nucleosomas, podrían contribuir indirectamente al efecto nefritogénico de los anticuerpos anti-DNA en los pacientes con LEG. De acuerdo a esta propuesta las histonas se pueden unir a la colágena tipo IV y a los proteoglicanos (heparan sulfato) de la membrana basal glomerular. Subsecuentemente estas histonas "plantadas" atraen al DNA el cual es reconocido por los anticuerpos correspondientes.

Otra alternativa es que los complejos de nucleosomas con anticuerpos anti-DNA o anti-nucleosoma puedan unirse a la membrana basal glomerular a través de las histonas. Estas hipótesis han sido propuestas al observar que muchos complejos inmunes nativos no se unen a la membrana basal glomerular, a menos que estén cationizados o tengan componentes con carga positiva. Con base en la hipótesis del antígeno "plantado", uno podría predecir que los anticuerpos anti-histona pueden ser tan nefritogénicos como los anticuerpos anti-DNA, sin embargo la nefritis está esencialmente ausente en el lupus inducido por droga.

Interesantemente, un análisis de los reportes sobre anticuerpos anti-histona en los pacientes con LEG ha mostrado que no ha sido obtenida evidencia alguna de la unión específica de IgG a la histona (15,16,26). Ponner y colaboradores en 1987 reportan una alta prevalencia de anticuerpos para histonas en pacientes con cirrosis biliar primaria (27).

En cuanto a los métodos de detección de estos anticuerpos se ha descrito que las histonas en la forma de histona total y/o componentes separados H1,H2A,H2B,H3 y H4, se pueden obtener a partir de timo de ternera, timo de conejo, hígado de rata o eritrocitos de pollo (28,30,31), lo que ha permitido implementar diferentes técnicas de alta sensibilidad y especificidad. En 1987 Rubin y colaboradores emplearon métodos inmunoenzimáticos en fase sólida para la detección de anticuerpos anti-histonas y reportaron que cerca de un 50% de los sueros de pacientes con LEG sin tratamiento y un 83% de pacientes con enfermedad activa pueden ser positivos a este marcador (29). En 1986 Costa y colaboradores llevan a cabo la detección de anticuerpos en sueros de LEG por el método de ELISA e Inmunoelctrotransferencia obteniendo excelentes resultados (18)

Por otra parte, se ha descrito que los anticuerpos anti-histonas pueden reconocer otros epítopes, como la IgG, o proteínas no histonas, así como algunas estructuras del DNA, sin embargo algunos estudios recientes (26,28,31) han propuesto que esta unión no se lleva a cabo a través de la porción F(ab')₂ sino que el reconocimiento del DNA depende de una interacción inespecífica con los agregados de IgG o con los complejos inmunes (DNA/anti-DNA).

Topoisomerasa-1 y anticuerpos contra esta proteína

La DNA-Topoisomerasa-1 (Topo-I) es una enzima nuclear responsable de mantener, controlar y modificar la estructura del DNA durante la replicación, transcripción y recombinación de material genético, catalizando la relajación negativa de la superhélice del ácido nucleico (32,70).

Es un polipéptido simple que presenta un peso molecular entre 70 a 100 Kd, el sitio enzimáticamente activo constituido por 4 dominios se encuentra en el fragmento carboxilo terminal (de 67.7 Kd) entre los aminoácidos 344 y 483. De

hecho, el tercer dominio de esta porción carboxilo terminal, contiene muchos residuos altamente conservados, forma el sitio activo, el cual se caracteriza por la presencia de tirosina en la posición 319 (Tyr 319). El análisis estructural indica que la Topo-I puede interactuar con el extremo 3' del DNA durante la fase de formación de la hendidura, durante la cual esta enzima actúa como un puente para el paso de una de las cadenas ó hebras del DNA. Durante el evento del paso del DNA, la Topo-I forma un puente en el extremo 5' (interacción covalente) y el extremo 3' (interacción no covalente) de la cadena rota. La Tyr 319 interactúa con varios aminoácidos conservados que incluyen a las Glu 9, Lys 13, Asp 111, Asp 113, Glu 115, Gln 309, Glu 313, Tyr 312 y Arg 321 formando una extensa red de puentes de hidrógeno que incluye varias moléculas de agua y un puente salino. La Tyr 319 está unida fuertemente por un enlace de hidrógeno con una molécula de agua al Asp 111 y directamente con 2 moléculas de agua al Asp 113 y Glu 115. La conformación espacial de estos 3 residuos acídicos es parecida a la conformación del residuo acídico en el sitio de la exonucleasa del fragmento Klenow de la DNA polimerasa-I de E. coli, cuyo grupo fosfato dTMP tiene la propiedad de unirse al Zn^{2+} (32,33,34,35).

La Topo-I es crítica para la función del DNA y la supervivencia celular. Se ha identificado como blanco celular para varias drogas anti-carcinogénicas clínicamente activas, en particular la camptotecina (36). Esta enzima es independiente del ciclo celular y su actividad no cambia con las diferentes fases del crecimiento, induce la ruptura de una de las cadenas de DNA y es independiente de ATP (32,33). Por otra parte, trabaja como un monómero y la dirección de cada reacción esta determinada por la energía libre de los segmentos de DNA que están involucrados en el proceso de reconocimiento.

La actividad enzimática de la Topo-I puede ser regulada por varios mecanismos que incluyen la cromatina, proteínas nucleares tales como las histonas las cuales compiten con la Topo-I por el sitio de unión con el DNA y poliaminas naturales tales como la espermina ó la espermidina que tienen diferente efecto sobre la Topo-I. La fosforilación puede activar ó inactivar a la Topo-I. Cuando la tirosina es fosforilada por una proteína cinasa, la Topo-I se activa tanto *in vitro* como *in vivo*,

ya que la cinasa cataliza la fosforilación de los residuos de tirosina y lo mismo ocurre cuando la topo-I se enfrenta a residuos de serina. También se ha descrito que la modificación estructural y covalente por fosforilación ó ataque de una cola de poli (ADP-ribosa) inactiva a la Topo-I *in vitro*. La Topo-I permite el desenrollamiento y relajamiento de la cadena de DNA superenrollado, actuando preferentemente sobre genes activos, y debido a que la regulación de su actividad depende de varios mecanismos de fosforilación, ésta puede ser una de las vías por la cuál las proteínas cinasas controlan la expresión de distintos genes a través de la Topo-I (39,40).

Una de las hipótesis que prevalece actualmente, es que los promotores tumorales ejercen un efecto biológico induciendo una alteración programada sobre la expresión del gene en un proceso que involucra la activación de PKC (proteína cinasa C), sin embargo, el camino responsable para traducir la señal generada por la activación de PKC a la maquinaria transcripcional se desconoce. Una posibilidad es que la inserción de la PKC active a la superficie de la membrana plasmática induciendo una cascada bioquímica en la que se lleva a cabo la fosforilación de un polipéptido que está involucrado en la regulación de la transcripción. Alternativamente, estos cambios pueden ser el resultado de una fosforilación y activación directa de factores de transcripción a través de un componente nuclear de PKC. La fosforilación de la Topo-I por una PKC purificada puede reactivar la actividad relajante del DNA (40).

La Topo-I es inhibida por campotecina, la cual inhibe la síntesis de DNA y RNA en células tumorales e induce la ruptura de cadenas de DNA simples asociadas a proteínas, por lo cual la Topo-I es identificada como el blanco intracelular para la droga. Otro potente inhibidor de la Topo-I es el zinc el cual actúa directamente sobre la enzima. También es un activador de algunas enzimas como son anhidrasa carbónica y las DNA-polimerasas, e inhibe a otras como la profil-hidroxilasa y fosfofructoquinasa, lo que explica en parte su efecto antifibrótico.

Los anticuerpos contra Topo-I fueron descritos por primera vez en 1986 por tres grupos diferentes que reportaron en forma independiente que, el antígeno reconocido por estas inmunoglobulinas era una proteína de 70 kda. Debido a que

su presencia ocurrió en particular en pacientes con esclerodermia se denominó a este antígeno como Scl-70. Más adelante se encontró que los sueros positivos reaccionaban con Topo I. La tinción nucleolar moteada sobre impuesta a un patrón nucleoplásmico moteado de manera densa al realizar inmunofluorescencia indirecta en las muestras positivas al anticuerpos anti-Topo-I fue consistente con la localización de esta enzima en el nucleoplasma, el nucleólo y en las regiones de organización nucleolar (NOR) (41).

La proteína ha sido reconocida mediante diversos inmunensayos. La inmunoelectrotrasferencia demostró que el anticuerpo anti-Topo-I reconocía un producto nativo de 95 a 100 Kda. Dependiendo de la fuente antigénica y de las condiciones utilizadas en el gel de electroforesis, se encontró la unión de anticuerpos con productos de distintos pesos moleculares. Uno de los reportes más comunes fue la aparición de un producto de degradación de 70 kda. En la década de los 90's fue descrito un epítoto inmunodominante de la célula B (denominado epítoto III) que se encontraba en la región carboxilo terminal de la Topo-I (42,45).

Relación de los AANH y anticuerpos anti-Topo-I

Los AANH han sido descritos en diversas enfermedades con autoinmunidad y frecuentemente coincide con la positividad de anticuerpos contra otros componentes nucleares, por lo que se ha considerado que esta respuesta inmune puede depender de la formación de distintos complejos antigénicos. Entre las evidencias que sustentan esta posibilidad esta la demostración de anticuerpos anti-DNA, anti-ribonucleoproteína (RNP), anticentrómero y anti-Topo-I en estrecha relación con AANH (15,27,37). Aunque el LEG no parece ser una patología en la que se identifique con frecuencia la presencia de anticuerpos anti Topo-I, recientemente se ha descrito la coincidencia de AANH que ocurren frecuentemente en LEG con anticuerpos contra Topo-I que son comunes en esclerodermia. Además este perfil serológico se ha relacionado con la presencia de fibrosis pulmonar.

Desde una perspectiva estructural en el nucleosoma completo, la H1 y la mitad amino terminal de H2B ocupan una región externa y expuesta del nucleosoma completo lo que ha sugerido que ambos componentes pueden ser inmunogénicos. La formación de autoanticuerpos y particularmente los AANH puede ocurrir también por mecanismos de reconocimiento de epítopes durante la síntesis y almacenamiento extranuclear de las histonas o su liberación consecutiva a los procesos de apoptosis o muerte celular, durante los cuales las nucleohistonas pueden tener una interacción con otros componentes citoplasmáticos y nucleares, incluyendo a la Topo-I (38,42,67). Adicionalmente, se ha sugerido que el reconocimiento de AANH pueda deberse a un mecanismo de mimetismo molecular, y los datos que lo apoyan incluyen la posibilidad de reconocimiento contra un antígeno centromérico denominado CENP-A (proteína centromérica-A) que tiene similitud antigénica en la secuencia de aminoácidos con histonas y especialmente con H3 (38,43).

En el caso del DNA y RNP, se ha demostrado la formación de complejos antigénicos con las nucleohistonas, lo que puede favorecer la aparición de anticuerpos contra ambas especificidades. En cuanto a la Topo-I algunas evidencias pueden sustentar este último mecanismo, puesto que esta enzima no solo se une a secuencias de bases en el DNA abierto sino que participa en el mecanismo de condensación cromosómica, durante la formación de los nucleosomas a cuyos componentes se puede unir (44,45). En apoyo a esto, el análisis de la secuencia de Topo-I ha sugerido que una porción aminoterminal altamente cargada en este polipéptido, puede tener una interacción con H1 (42,66). Además, algunos estudios recientes han sustentado esta posibilidad y han mostrado que la H1 es un inhibidor competitivo de la actividad biológica de Topo-I (45).

Entre los datos que se pueden proponer para explicar la coincidencia de los AANH y anti-Topo I, en lupus se encuentran los antecedentes genéticos, como lo demuestra la frecuencia elevada de anticuerpos anti-Sm y anti RNPn en poblaciones orientales (12,14,46). Adicionalmente, la respuesta inmune dirigida

contra diferentes componentes del núcleo en LEG puede hacer factible la generación de reactividad contra más de un componente celular.

El hallazgo frecuente de anticuerpos contra Topo-I en trabajos sobre esclerodermia e incluso su relación con fibrosis pulmonar, documentada recientemente (47,48) en conjunto con las evidencias de AANH asociados con este tipo de alteraciones respiratorias, sugieren que estas respuestas inmunes están relacionadas, y su producción puede ocurrir mediante el reconocimiento de un complejo antigénico histonas-Topo-I.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En LEG no hay estudios que permitan establecer la frecuencia de reactividad inmune contra más de un componente nuclear y si ésta puede ser debida a una reacción cruzada. Es posible también, que las clonas autoreactivas puedan reconocer epítopes íntimamente relacionados cuya expresión serológica se manifieste como la presencia de más de un autoanticuerpo.

Por ello, en este trabajo se planteó estudiar la frecuencia de pacientes con anticuerpos simultáneos anti-nucleohistona y anti-Topo-I, así como caracterizar la posible reacción cruzada a dichos antígenos.

OBJETIVOS

Estudiar con que frecuencia se presentan los anticuerpos Antinucleohistona (AANH) y anti-Topo I en pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG).

Analizar si la presencia simultánea de AANH y de anti- Topo-I esta determinada por una reacción cruzada debida al reconocimiento de los antígenos respectivos.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

Se incluyeron a 65 pacientes con LEG, quienes fueron seleccionados de acuerdo a los criterios internacionales para su diagnóstico (53). A todos los pacientes se les realizaron estudios de laboratorio que incluían: biometría hemática completa, velocidad de sedimentación globular, examen general de orina, química

sanguínea, depuración de creatinina y los estudios que resultaron pertinentes. También se realizó una evaluación serológica completa, según lo determinaron las variables clínicas de cada paciente. Se incluyó el estudio de IgG, IgM e IgA, C₃, C₄ por nefelometría y CH₅₀ en unidades hemolíticas. En los casos con fenómeno de Raynaud se incluyó además anticuerpos antifosfolípidos (cardiolipina) (IgG e IgM) por ELISA debido a su relación con estos cambios. Se realizó perfil completo de anticuerpos incluyendo anticuerpos anti-DNA nativo por *Crithidia luciliae*, así como anticuerpos anti Sm, RNP, SSA(Ro) y SSB (La) por Ouchterlony.

Cada paciente otorgó la autorización para coleccionar una muestra de sangre periférica para fines de Investigación. Esta petición se hizo antes de la realización del procedimiento, siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki (54).

Fueron excluidos del estudio pacientes con el diagnóstico de enfermedad mixta del tejido conectivo o con otra enfermedad autoinmune, que no cumplieron con los criterios de clasificación de LEG del Colegio Americano de Reumatología. Se eliminaron del estudio a pacientes que no aceptaron participar voluntariamente, o cuya enfermedad impidió la realización del estudio serológico.

Las alteraciones pulmonares detectadas mediante historia clínica, radiología o pruebas de función pulmonar, fueron evaluadas por el médico tratante. Los sueros de los pacientes con LEG fueron seleccionados por su perfil serológico mediante inmunofluorescencia indirecta. Como controles se incluyeron a 40 sueros de donadores de sangre sanos, captados a través del Banco de Sangre de nuestro Instituto.

La detección inicial de los autoanticuerpos se realizó por inmunofluorescencia indirecta y su inmunoespecificidad a DNA nativo fué determinada usando como sustratos monocapas de líneas celulares humanas HEp-2 y el hemoflagelado *Crithidia luciliae* (55,56,68). Para realizar esta técnica, la dilución inicial del suero problema fue de 1:40 en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), el anticuerpo anti-IgG marcado con fluoresceína, se empleó a una dilución de 1:100 y la interpretación de la positividad se fundamentó en el análisis del tipo de fluorescencia nuclear en el primer sustrato y del cinetoplasto con *Crithidia luciliae* (57).

Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Empleando como sustrato células Hep-2

Para determinar el patrón de tinción de los anticuerpos antinucleares por éste método, los sueros problema y los sueros control negativo y positivo fueron diluidos 1:40 en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.1M, pH 7.2), en seguida se cubrió una laminilla que contenía las monocapas de células Hep-2. La laminilla se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos, y en seguida se lavó con PBS por 10 minutos, después se lavó con agua fría. Terminado este proceso, la placa se cubrió con antigamaglobulina humana conjugada con fluoresceína diluida 1:100 y se incubó por 30 minutos en obscuridad a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se lavó con PBS y se montó en un cubreobjetos con glicerina fosfato, manteniendo la laminilla en una caja oscura. Por último se examinó el patrón tincional empleando un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss).

La tinción fluorescente del núcleo fue clasificada en los siguientes patrones:

Lineal Periférico o anular (LP): Tinción fluorescente característica del borde del núcleo.

Moteado (M): Aparición de un gran número de motas brillantes en el núcleo.

Homogéneo Difuso (HD): Tinción uniforme a través de todo el núcleo.

Nucleolar (N): Se refiere a la tinción del nucleólo.

Citoplasmático (C): El citoplasma de cada célula toma una apariencia granular. Puede corresponder a anticuerpos antimitocondria, ribosomal o anti-músculo liso.

Anticuerpos anti-DNA nativo (DNAn)

Empleando como sustrato *Critihidia lucillae*

Las muestras problema y las muestras control positivo y negativo fueron incubadas a temperatura ambiente a una dilución 1:20. El excedente de suero fue removido por lavado con PBS, agregando después anti gamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína, en seguida se lavó nuevamente y se observó en el microscopio de epifluorescencia. La tinción fluorescente del cinetoplasto solo ó del cinetoplasto y del núcleo nos indicó un resultado positivo,

mientras que la tinción sólo del núcleo sin marca en el cinetoplasto, nos indicó un resultado negativo.

Anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA) Sm, RNP, SS(Ro), SSB(La), Scl-70 . Por el método de Inmunodifusión de Ouchterlony.

Este método consiste en colocar un soporte de agarosa al cual se le hace una horadación central y cuatro laterales. La suspensión que contiene los ENA se colocó en el pozo central de la placa de agarosa, en tanto que las muestras de los pacientes y los controles positivo y negativo previamente diluidas 1:2 y 1:4 se colocaron en cada uno de los pozos laterales. Los resultados se establecieron de acuerdo a la identidad inmunoquímica, representada por una ó más bandas de precipitación evidenciadas en la agarosa, usando sueros prototipos comerciales.

Anticuerpos contra nucleohistonas por ELISA

Los sueros seleccionados se emplearon para la determinación de anticuerpos contra nucleohistonas totales mediante un método inmunoenzimático (ELISA). Para ello, se sensibilizaron placas de poliestireno con 20 µg/ml de nucleohistonas totales (Sigma Co) en amortiguador de carbonatos pH 9.6. Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina al 3%. Los sueros fueron diluidos 1:100 con PBS-tween-albumina al 1% y se incubaron por 24 horas a 4°C. En seguida se incubó un anticuerpo anti-IgG marcado con peroxidasa y el revelado se realizó con ortofenilendiamina (Sigma Co) en una solución de citratos 0.1 M. pH 5.5, procediendo a parar la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. La lectura se registró a 492 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Labsystem).

Anticuerpos contra Topoisomerasa-I por ELISA

Los sueros seleccionados se emplearon para la determinación de anticuerpos contra Topoisomerasa-I recombinante mediante un método inmunoenzimático (ELISA). Para ello, se sensibilizaron placas de poliestireno con 20 µg/ml de Topoisomerasa-I recombinante en amortiguador de carbonatos pH 9.6.

Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina al 3%. Los sueros fueron diluidos 1:100 en PBS-tween-albúmina, se colocaron 100 μ l en cada cavidad y se incubaron por 24 horas a 4°C. En seguida se incubó un anticuerpo anti IgG marcado con peroxidasa y el revelado se realizó con ortofenilendiamina (Sigma Co) en una solución de citratos 0.1M. pH 5.5, procediendo a parar la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. La lectura se registró a 492 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Labsystem).

Anticuerpos contra nucleohistonas y Topoisomerasa-I por Inmunolectrotransferencia.

La confirmación de la especificidad se realizó por inmunolectrotransferencia, para lo cual se llevó a cabo una electroforésis vertical en gel de poliacrilamida al 15% con SDS (PAGE). Después de transferir a membranas de nitrocelulosa y bloquearlas con albúmina bovina al 1% se realizó la incubación de 12 hr a T.A. de los sueros positivos por ELISA empleando una dilución de 1:50 en PBS-Tween-20 al 0.1%. Al término de esto, se empleó un preparado de proteína A marcado con peroxidasa, y el revelado se realizó con 4-cloronaphtol.

Evaluación del reconocimiento de epítopes compartidos

A fin de obtener evidencias sobre el reconocimiento de epítopes compartidos en nucleohistonas y Topo-I, se realizó un ensayo de inhibición. Para ello se empleó un antígeno recombinante (Topo-Ir), previamente obtenido mediante los métodos descritos con anterioridad (48) con y sin nucleohistonas totales (Sigma Co.). Para formar el complejo Histona-Topo-I, se preincubó la proteína recombinante por 2 hr a 37°C con nucleohistonas totales purificadas, cuya característica fue estar constituidas por H1, H2A/2B, H3, H4 y H5 (Sigma Co.). Posteriormente se realizó una sensibilización de este complejo antigénico en placas de poliestireno (Maxisorb, Nunc) y su detección respectiva se evaluó mediante el uso de sueros prototipos mono-específicos anti-histonas y anti-Topo-I. En una segunda fase, se estudió este reconocimiento de antígenos compartidos en los sueros de pacientes con LEG a fin de demostrar la frecuencia de este tipo de reacción inmune.

También se realizó la detección simultánea de anticuerpos anti-Topo-I y AANH mediante inmunolectrotransferencia con un extracto de células HEp-2, Topo-I recombinante y nucleohistona total (Sigma), usando sueros prototipo anti-H1, H2A/2B, H3, H4 y H5, así como anti-Topo-I.

Análisis de los resultados

Las anomalías serológicas a partir de la inmunolectrotransferencia, en la cual se caracterizó la especificidad con base a un suero comercial mono específico anti-Topo-I, tanto por su reconocimiento del antígeno por peso molecular, como por comparación con otros tipos de inmunoespecificidad.

Los resultados fueron analizados mediante las pruebas de U de Mann Withney cuando se evaluaron medidas de tendencia central y la prueba de Fisher para variables dicotómicas, a fin de comparar las características clínicas de los pacientes y su relación con anticuerpos anti-Topo-I y AANH.

RESULTADOS

Debido a que este trabajo se realizó en un grupo de pacientes con LEG en quienes se estudió inicialmente la presencia de anticuerpos antinucleares como parte de su estudio clínico, consideramos importante describir los resultados que se obtuvieron al identificar dichos marcadores.

Anticuerpos antinucleares por IFI en los pacientes con LEG

La presencia de anticuerpos antinucleares mediante la técnica de inmunofluorescencia en nuestro grupo de LEG, reveló resultados positivos en 61 de los 65 casos (93.8%) incluidos en este trabajo. Treinta pacientes presentaron fluorescencia positiva con un patrón moteado, 26 un patrón homogéneo difuso y 24 una tinción lineal periférica. En los tres casos restantes se encontró un patrón nucleolar (2) y citoplásmico (1). En contraste el estudio de estos marcadores en el grupo control reveló que los 40 sueros de los donadores sanos captados en el banco de sangre presentaron anticuerpos antinucleares negativos. Estos datos se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Patrones tincionales de los anticuerpos antinucleares por la técnica de IFI

Tipo de Fluorescencia	*No. de sueros	%
N=61		
Moteado (M)	30	49.18
H. Difuso (HD)	26	42.62
L. Periférico (LP)	24	39.34
Nucleolar (N)	2	3.27
Citoplásmico (C)	1	1.63
**2 patrones tincionales	22	36.06

*Los totales no suman 61, debido a que los patrones de fluorescencia se analizan por separado. **11 muestras fueron positivas al patrón HD y LP, 7 tuvieron tinciones LP y M, 2 presentaron patrones HD y M, un caso mostró fluorescencia M y N y otro enfermo tuvo patrones M y C. Los 40 controles sanos tuvieron resultados negativos a la IFI.

Al estudiar la inmunoespecificidad de los anticuerpos antinucleares por el método de IFI mediante el uso de monocapas de *Crithidia luciliae* como sustrato, se encontró la presencia de anticuerpos contra DNA nativo (DNAn) en 30 sueros (49.1%), mientras que por Ouchterlony 11 casos fueron positivos a RNPn (18.0%), 4 presentaron anticuerpos anti-Sm (6.5%), dos muestras con la combinación de estos dos anticuerpos, anti-Sm y anti-RNP otros 2 con anticuerpos anti-SSA(Ro). En 8 casos de los 61 no se demostró especificidad para anticuerpos anti-DNAn y anti-ENA. Estos resultados se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Inmunoespecificidad de los anticuerpos antinucleares por IFI y Ouchterlony

Especificidad Inmunoquímica	Núm. Sueros	%
DNA ⁿ *	30	49.1
RNP ^{**}	11	18.0
Sm ^{**}	4	6.5
Sm/RNP ^{**}	2	3.2
SSA ^{**}	1	1.6
SSA/DNA ⁿ ** y*	1	1.6
DNA ⁿ /Sm* y*	4	6.5
Sin especificidad	8	13.1

Total de sueros: 61; * IFI *Crithidia luciliae*; ** Ouchterlony; No se incluye las especificidades para NH y Topo-I, debido a que estos métodos no se emplearon para definir estas características. Los 40 sueros de los controles sanos fueron negativos en estas pruebas.

El suero de pacientes con LEG tienen AANH y anticuerpos anti-Topo-I

La evaluación de los AANH mediante ELISA reveló que 21 de los 61 pacientes (32.3%) con LEG fueron positivos. Este porcentaje se obtuvo al establecer como límite de corte la media +2 D.E. de los controles sanos. Al comparar los resultados obtenidos en el grupo con LEG y dichos controles se encontró un valor estadísticamente significativo ($P = 0.000000005$). En la figura 1 se muestran los niveles de AANH en ambos grupos de estudio.

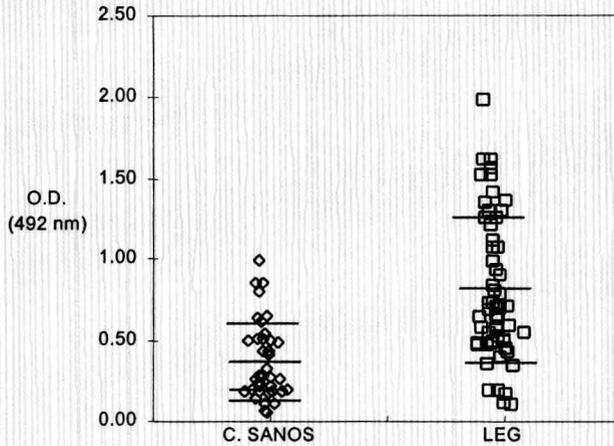


Figura 1. Anticuerpos anti-nucleohistona por ELISA, resultados en pacientes con LEG comparados con los controles sanos. Las líneas horizontales representan la media \pm D.E. de cada grupo.

Por otra parte, el análisis de los anticuerpos contra Topo-I que fue realizado mediante ELISA empleando nuestra proteína recombinante reveló que 18 de los 65 pacientes con LEG (27.6%) que se incluyeron en este estudio presentaron niveles superiores al límite de referencia de los controles sanos. Los casos con LEG presentaron niveles de anticuerpos anti-Topo-I que excedieron los límites de referencia de los controles sanos ($p=0.00000005$) (figura 2).

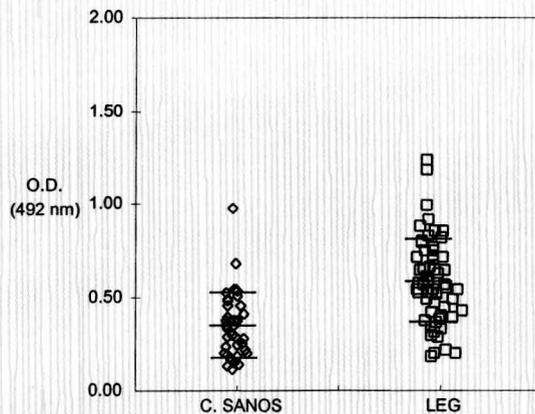


Figura 2. Anticuerpos anti-Topo-I por ELISA, resultados en pacientes con LEG comparados con los controles sanos. Las líneas horizontales representan la media \pm D.E. de cada grupo.

La presencia simultánea de AANH y anticuerpos contra Topo-I, se encontró en el 18.4% de los pacientes con LEG al considerar como valores de referencia en cada sistema la media +2 D.E. de los controles. Los niveles individuales de estos casos mostraron que mientras que algunos pacientes presentaban títulos elevados de AANH y anticuerpos contra Topo-I, en otros predominaban los anticuerpos elevados contra alguno de los componentes (cuadro 2). Los resultados de los sueros negativos tanto en el LEG como en el grupo control, también se muestran en el cuadro 3.

Debido a que nuestro estudio podría tener aplicación clínica, intentamos relacionar los hallazgos serológicos con las variables clínicas (accesibles en el expediente de cada paciente), sin embargo la presencia simultánea de los anticuerpos contra nucleohistonas y Topo-I no mostró asociación alguna con las características clínicas de los pacientes estudiados.

Cuadro 3. Muestras con anticuerpos positivos para nucleohistonas y Topo-I

Sueros	**NH +	*Topo-1+	**NH +, *Topo-1+	**NH - *Topo -	Totales
LEG (n=)	21	18	12	36	65***
	32.3%	27.6%	18.4%	55.3%	-
C. Sanos (n=)	3	1	0	36	40
	7.5%	2.5%	-	90%	-

*Topo-I +/-: anticuerpos anti-Topo-I positivos o negativos; **NH, nucleohistonas +/- anticuerpos anti-NH, nucleohistonas positivos o negativos.

*** Incluye los 4 sueros con anticuerpos antinucleares negativos.

Identificación de anticuerpos mediante inmunoelectrotransferencia

El estudio de los sueros con AANH positivos por ELISA fue confirmado mediante inmunoelectrotransferencia. Este método permitió definir la especificidad de los anticuerpos en LEG y se encontró que el reconocimiento de los sueros positivos correspondía principalmente al complejo H2A/2B. Por otra parte la identificación de los anticuerpos anti-Topo-I mediante este método se confirmó en todos los sueros que presentaban lecturas positivas por ELISA.

Ensayo de inhibición

Los datos más importantes que se obtuvieron al realizar la prueba de inhibición competitiva con nucleohistonas ó Topo-Ir fueron: Los niveles de los AANH mediante la prueba de ELISA en los sueros representativos que presentaban únicamente este tipo respuesta inmune mostraron una disminución significativa al usar una fuente comercial de nucleohistonas (56.0 al 100 %), mientras que al preincubar los sueros con Topo-Ir, no se apreciaron cambios importantes en las lecturas de los AANH.

Por otro lado, las muestras que fueron seleccionadas por su positividad a la Topo-I, mostraron una reducción sustancial en los títulos de estos anticuerpos al realizar la preincubación con la mayor concentración de la Topo-Ir (10 µg al 99.8%), en cambio al usar nucleohistonas no se encontró modificación alguna en los niveles de los anticuerpos anti-Topo-I.

Cuando se analizaron los sueros de los pacientes con LEG con ambos tipos de anticuerpos, se apreció lo siguiente: La incubación con nucleohistonas dió por resultado un descenso único en los niveles de los AANH y el uso de Topo-Ir afectó únicamente los valores de los anticuerpos con esta última especificidad. En la figura 3 presentamos los resultados que se obtuvieron en los sueros de LEG que fueron seleccionados para este experimento. Tomando en cuenta los valores basales en cada sistema antigénico, se logró apreciar un descenso sustancial de los AANH y anticuerpos anti-Topo-I usando su propia fuente antigénica. Además, estas modificaciones fueron mayores cuando los sueros de LEG se preincubaron con una mayor concentración del antígeno correspondiente.

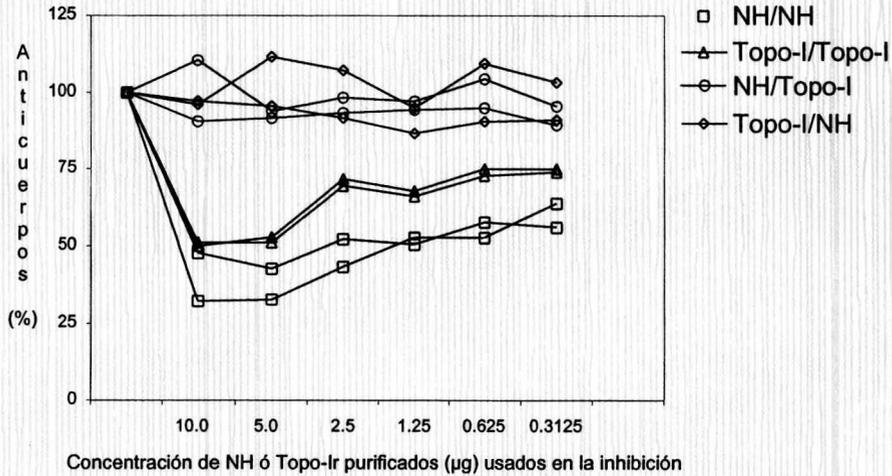


Figura 3. Resultados mediante ELISA, obtenidos al realizar una inhibición competitiva con los antígenos NH totales y Topo-I recombinante a concentraciones decrecientes. NH/NH, NH-Topo-I: indica que la placa de ELISA fue sensibilizada con NH e inhibida con NH o sensibilizada con NH e inhibida con Topo-I. Lo mismo es aplicable para Topo-I. Las líneas corresponden a 4 casos representativos con LEG.

DISCUSION

Los anticuerpos antinucleares son alteraciones inmunológicas importantes en algunas enfermedades autoinmunes, particularmente en el LEG (10,12). Además de la descripción de anticuerpos contra el DNA y proteínas no histonas como el Sm y RNP, se han descrito otro tipo de autoanticuerpos (13).

Los AANH fueron descritos en 1971 (15) y desde entonces han surgido distintos trabajos que han señalado las características que distinguen a este tipo de alteraciones en el LEG. Algunos autores han reportado que los AANH pueden ocurrir en el 50% (18,31,49) al estudiar a pacientes no seleccionados, mientras que esta cifra puede elevarse hasta un 83% en enfermos con LEG activo (28,31,49). En algunos trabajos recientes se ha señalado que es posible que la presencia de estos marcadores haya sido sobre estimada y esto depende en parte

de los métodos de detección, o el tipo de pacientes estudiados (10,11,50,51). En los estudios más recientes se acepta que alrededor de una tercera parte de los casos con LEG presentan AANH al usar métodos inmunoenzimáticos y que los antígenos más importantes contra los cuales está dirigida la respuesta inmune incluyen componentes específicos de H1, H2A y H2B (52,57).

En este trabajo encontramos que la frecuencia de AANH mediante ELISA fue comparable con un reporte previo en el cual se ha descrito que la inmunoglobulina G puede reconocer a las histonas totales en el 27% de los pacientes con LEG (58), pero el hallazgo más relevante de nuestro estudio fue que la presencia simultánea de AANH y anticuerpos anti-Topo-I ocurrió en el 18.4% de los sueros de pacientes con LEG. Aunque dichos anticuerpos han sido descritos en forma anecdótica (41), en un reporte reciente en el que se analizó un grupo de 125 pacientes, se encontró que la frecuencia de anticuerpos anti-Topo-I fue similar a la nuestra (59). En contraste, la coincidencia de los AANH con otros autoanticuerpos, como las inmunoglobulinas contra DNA parecen ser más comunes, al menos en algunos reportes (58,60).

El interés por estudiar la presencia de AANH y anti-Topo-I en LEG derivó en primera instancia de observaciones previas en nuestro laboratorio respecto a la aparición simultánea de anticuerpos contra distintos componentes nucleares (12). Al realizar un trabajo previo, reportamos que los anticuerpos anti-DNA y anti-Sm coincidieron en un bajo porcentaje en el LEG. En apoyo a esta observación se ha descrito que los pacientes que presentaban anticuerpos anti-DNA y anti-Sm ó RNPn eran mutuamente excluyentes ya que generalmente predominaba el reconocimiento de uno de estos antígenos (61).

Por otra parte, se ha propuesto que la respuesta inmune en procesos autoreactivos puede depender de la formación de distintos complejos antigénicos. En cuanto al DNA y RNP, se ha encontrado que la formación de complejos antigénicos con las nucleohistonas puede inducir la aparición de anticuerpos contra ambos componentes. Algunos datos anteriores indican que la Topo-I no solo se une a secuencias de bases en el DNA abierto sino que participa en el mecanismo de condensación cromosómica, durante la formación de los

nucleosomas a cuyos componentes se puede unir (44,45). De hecho, al analizar la secuencia de Topo-I se ha sugerido que una porción aminoterminal puede tener una interacción con H1 (67). Por otra parte, la liberación de las nucleohistonas consecutiva a los procesos de apoptosis o muerte celular, pueden tener una interacción con otros componentes citoplasmáticos y nucleares, incluyendo a la Topo-I (38,67).

Otro mecanismo que puede explicar la presencia de más de un anticuerpo es el mimetismo molecular, y entre los argumentos que sustentan esta posibilidad está el reconocimiento de antígenos centroméricos que tiene similitud antigénica en la secuencia de aminoácidos con histonas y especialmente con H3 (43).

Finalmente, las características étnicas o inmunogenéticas pueden influir en la formación de autoanticuerpos que pueden reconocer más de un epitope. Al respecto se ha descrito una frecuencia alta de anticuerpos anti-Sm y anti RNPn en poblaciones orientales y negros americanos (46,61). Por otro lado en LEG, las características inmunogenéticas que dependen del sistema mayor de histocompatibilidad pueden asociarse con la presencia de anticuerpos que tienen un reconocimiento antigénico específico (63).

Los resultados que presentamos en esta tesis pueden ser explicados de la siguiente manera: a) Que los anticuerpos se generen debido a la formación de un complejo antigénico constituido por nucleohistonas y Topo-I; b) Que como una consecuencia a la reacción cruzada de las inmunoglobulinas independiente contra epítopes presentes en ambos componentes nucleares, y c) Que la aparición de estas inmunoglobulinas sea una manifestación adicional de la polirreactividad inmunológica que caracteriza al LEG y que explica la presencia simultánea de otros autoanticuerpos.

Nuestro estudio apoya la última posibilidad de acuerdo a las siguientes consideraciones. Es poco probable que si los anticuerpos se generaran originalmente por un complejo antigénico de nucleohistonas y Topo-I se encontrará una clara separación de la inmunoreactividad en los sueros con AANH y anti-Topo-I. Además, el efecto competitivo de antígenos purificados en los niveles de anticuerpos analizados permite sustentar que estas inmunoglobulinas

reaccionan específicamente con los epítopes de cada sistema antigénico. El hallazgo de anticuerpos independientes dirigidos en contra de componentes nucleares distintos indica que en el LEG se producen tanto AANH como anticuerpos anti-Topo-I de manera simultánea en un número limitado de casos.

A favor del fenómeno de multi-especificidad se ha descrito la presencia de más de un anticuerpo en pacientes con LEG, algunos de ellos relacionados con la fase activa de la enfermedad. Los anticuerpos anti-DNA y anti-ribonucleoproteína (RNP) así como la reactividad contra el antígeno Sm y DNA nativo son ejemplos de este tipo de poliespecificidad contra componentes nucleares. Además, se ha descrito que los anticuerpos contra otros antígenos no nucleares como los fosfolípidos pueden aparecer de manera simultánea con anticuerpos anti-DNA en el LEG (64).

Es importante considerar que al haber empleado antígenos purificados comerciales como la nucleohistona total y una fuente recombinante de Topo-I no elimina la posibilidad de que los anticuerpos se comporten de manera diferente con antígenos nativos o que el fenómeno de reconocimiento compartido ocurra *in vivo*, porque un sistema "in vitro" no necesariamente es aplicable a las condiciones "in vivo" y porque durante la interacción "in vivo" de los antígenos blanco puede generar anticuerpos contra muy diferentes epítopes. Aunque las nucleohistonas y la Topo-I tienen una interacción biológica estrecha (65) e incluso pueden formar complejos antigénicos y estar en contacto con el sistema inmune después de la apoptosis ó al ocurrir un daño celular, la respuesta de producción de anticuerpos puede tener la capacidad de distinguir los epítopes de las nucleohistonas y de la Topo-I en forma independiente. Aunque los estudios de la secuencia de Topo-I ha sugerido que la porción amino terminal de esta proteína tiene cargas positivas y puede tener una interacción con H1 (67) no hay reportes semejantes a nuestro estudio en los que se analice la posibilidad de que en el LEG se generen anticuerpos contra ambos componentes nucleares. De hecho, al revisar la literatura encontramos que sólo un trabajo reciente reporta que los anticuerpos anti-Topo-I pueden encontrarse en el 25.0% de los pacientes con LEG (59) y que

existe una correlación con los anticuerpos anti-DNA, debiendo señalar que nuestro trabajo fué iniciado antes de la publicación de este estudio.

Por otra parte, se ha observado que la H1 es un inhibidor competitivo de la actividad biológica de Topo-I (45), pero no hay datos que apoyen la posibilidad de que en esta interacción pueda ocurrir un reconocimiento por anticuerpos. Otro mecanismo que podría explicar la presencia de más de un anticuerpo contra los componentes nucleares es la observación de que el anticuerpo anti-DNA nativo protege a este ácido nucléico del efecto de DNAsas, lo que haría posible un impedimento al requerirse la unión de la Topo-I (66) y otras enzimas que son esenciales en la relajación del DNA. Si estas condiciones ocurren *in vivo* se desconoce, pero deja abierta la posibilidad de que los anticuerpos puedan regular procesos biológicos intracelulares.

La interacción del DNA con las nucleohistonas, en particular con la H1 ha sido estudiada por cristalografía y actualmente se conoce que la interacción del DNA con residuos de lisina es una de las condiciones más importante en esta unión. La Topo-I es una enzima que se une al DNA y permite la relajación de la tensión superhelicoidal, por lo cual puede interaccionar con las nucleohistonas en forma muy diversa. En la literatura no se ha reportado previamente que los anticuerpos anti-DNA o anti-nucleohistonas reconozcan a la Topo-I, pero algunas observaciones sugieren que esta última puede reconocer proteínas fosforiladas del nucleosoma .

Al profundizar en el fenómeno de la multi-especificidad en las enfermedades autoinmunes, es importante reconocer que hay diferentes mecanismos potenciales mediante los cuales se puede lograr generar la producción de un anticuerpo con diferentes especificidades ó de múltiples anticuerpos dirigidos contra estructuras esencialmente distintas. Los anticuerpos contra Topo-I fueron reconocidos originalmente en la esclerodermia que es otra enfermedad distinta al LEG, en la cual es poco común la presencia de anticuerpos anti-DNA, pero es frecuente la positividad de anticuerpos contra nucleohistonas. La presencia simultánea de dos o más anticuerpos en LEG, esclerodermia y otras formas de autoinmunidad pueden tener como denominador común la presencia de una activación de la

respuesta humoral con producción de anticuerpos poliespecíficos. En trabajos previos nuestro grupo ha reportado la presencia de anticuerpos anti-DNA y anti-Sm en LEG como un fenómeno de poliespecificidad (12) y los datos actuales de anticuerpos anti-Topo-I y anti-nucleohistonas, son congruentes con dicha información. Nuestros datos sugieren que la aparición de anticuerpos contra diferentes antígenos nucleares puede ser debida a una polireactividad inmunológica, fenómeno que es característico de algunas enfermedades autoinmunes como el LEG.

CONCLUSIONES

Se detectaron AANH en LEG en un porcentaje similar (32.3%) al reportado por algunos autores cuando se estudia un grupo de pacientes no seleccionados.

Los anticuerpos anti-Topo-I fueron positivos en el 27.6% de los casos con LEG, usando como antígeno una proteína recombinante.

La presencia simultánea de anticuerpos anti-Histonas y anti-Topo-I se encontró en el 18.4% de los pacientes con LEG.

La prueba de inhibición mostró que los anticuerpos anti-Histona y las inmunoglobulinas con reactividad contra Topo-I no se unen a un epítoto compartido. El estudio competitivo con antígenos purificados permite sustentar que estas inmunoglobulinas reaccionan específicamente con epítotos de cada sistema antigénico.

Es necesario explorar la posibilidad de que los anticuerpos se comporten de manera diferente con antígenos nativos o que el fenómeno de reconocimiento compartido ocurra in vivo.

REFERENCIAS

1. McCarty DJ: Arthritis and allied conditions (11 Ed). Lea & Febiger (Philadelphia, London) 1-2045, 1989.
2. Spector LD: Nuclear domains. *J of Sci* 114: 2891-2893, 2001.
3. Jiménez GLF, Merchant LH: *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Editorial, Prentice Hall 341-394, 2003.
4. Echeverría MOM, Ontiveros LF: *Biología del Núcleo Celular* . Primera edición. Editorial, Las prensas de Ciencias 13-113, 2001.
5. Novikoff AB, Holtzman E: *Estructura y Dinámica Celular*. Primera edición. Editorial Interamericana 52-64, 1972.
6. Wiedemann HP, Matthay RA: Pulmonary manifestations of the collagen vascular diseases. *Clin Chest Med* 10:677-721, 1989.
7. Hunninghake GW, Fauci A: Pulmonary involvement in the collagen vascular diseases. *Am Rev Resp Dis* 119:471-503,1979.
8. Sahan SA: Immunologic disease of the pleura. *Clin Chest Med* 6:83-102,1985.
- 9.-Katsumi S, Kobayashi N, Yamamoto Y. *Br J Dermatol* 142:1030-1033, 2000.
10. Beaufils M, Kouki F, Mignon F, Camus JP, Morel-Maroger L, Richet G: Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 74:201-205, 1983.
11. Hedgpeth MT, Boulware DW: Interstitial pneumonitis in antinuclear antibody negative systemic lupus erythematosus. A new clinical manifestation and possible association with anti-Ro(SS-A) antibodies. *Arthritis Rheum* 31:545-548, 1988.
12. Martínez CE, Martínez ME, Negrete GMC, Padilla A: AntidsDNA and Sm autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheum* 11:341-345,1992.
13. Von MAC, Eng MT: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Sem Arthritis Rheum* 24:323-358, 1995.
- 14.- Clotet B, Guardia J, Oigraw C, Lience E, Murcia C, Pujol R, Bacardi R: Incidence and clinical significance of anti-ENA antibodies in systemic lupus erythematosus. Estimation by counterimmunoelectrophoresis. *Scand J Rheumatol* 13:15-20, 1984.
- 15.- Stollar BD: Reactions of systemic lupus erythematosus sera with histone

fractions and histone-DNA complexes. *Arthritis Rheum* 14:485-492, 1971.

16.- Kunkel HG, Holman HR, Deicher HRG: Multiple "autoantibodies" to cell constituents in systemic lupus erythematosus. CIBA Foundation Symposium: 429-437, 1960.

17.- Tax WJ, van Bruggen C, Berden, JH. Apoptosis: Nucleosomes, and nephritis in systemic lupus erythematosus (editorial). *Kidney Int.* 48: 666-673, 1995.

18.- Costa O, Monier JC: Antihistone antibodies detected By ELISA and immunoblotting in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 13:722-725, 1986.

19.- Tan EM, Robinson J, Robitaille P: Studies on antibodies to histones By immunofluorescence. *Scand J Immunol* 5:89-96, 1976.

20.- Fishbein E, Alarcón-Segovia D, Vega JM: Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 36:145-150,1978.

21.- Fritzler. M J, Tan EM: Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 62:560-567, 1978.

22.- Schmiedeke TMJ, Stockl FW, Weber R Sugi Saki, Batsford SR, Vogt A: Histones have high affinity for the glomerular basement membrane. Relevance for immune complex formation in lupus nephritis. *J Exp Med* 169: 1879-1894,1989.

23.- Fritzler M, Ryan P, Kinsella TD: Clinical features of systemic lupus. *J Rheumatol* 9:1,1982.

24.- Sheikht K, Charron RC, Katz: Renal Manifestations of drug-induced systemic-lupus erythematosus. *Am J Clin Pathol* 75:755-762, 1981.

25.- Mongey AB, Hcss EV: Drug and environmental lupus: Clinical manifestations and differences. In "systemic lupus erythematosus" (R.G. Lahita.Ed.) Academic Press San Diego. 1999.

26.- Hélène A, Gussin E, Helen N, Tselentis, and Teodorescu M: Noncognate binding to hstones of IgG fom patients with idiopathic systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 96:150-161, 2000.

27. Ponner E, Muller S, Zimmermann D, Van Regenmortel MHV: High prevalence of antibodies to histones among patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 70:47-52, 1987.

- 28.-Guo QS, Yehuda S, and James BP: Anti-DNA, antihistone, and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus and drug-Induced lupus. *Clin Rev Allergy Immunol* 16:321-334, 1998.
- 29.- Robert L, Rubin and Shinobu W: Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14:118-126, 1987.
- 30.- Gioud M, Kaci A and Monier JC: Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:4, 1982.
- 31.- Rubin RL: Antihistone antibodies in "systemic lupus erythematosus" (R.G. Lahita, Ed.) Academic Press. San Diego, 1999.
- 32.- Roca J: The mechanism of DNA Topoisomerases. *Tibs* 20:156-160, 1995.
- 33.- Christiansen K and Westergard O: Characterization of intra-and intermolecular DNA ligation mediated by eukariotic topoisomerase I. *J Biol Chem* 269:721-729, 1994.
- 34.- Sharma A and Mondragón A: DNA Topoisomerases. *Curr Opin Struct Biol.* 5:39-47, 1995.
- 35.- D'Arpa P, Mchlin PS, Ratrie H, Rothfield NF, Cleveland DW, Earnshaw WC: cDNA cloning of human DNA Topoisomerase-I catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2543-2547, 1988.
- 36.- Sinha BK: Topoisomerase inhibitors. *Drugs* 49:11-19, 1995.
- 37.- Martin LM, Pauls JD, Fritzler MJ: Antibodies to both histone and centromere define a subset of patients with severe escleroderma (abstract). *Clin Invest Med* 13:798-814, 1990.
- 38.- Rekvig OP: Intrinsic cell membrane antigens recognized by antichromatin autoantibodies: The membrane antigens do not derive from the nucleus. *Scand J Immunol* 6:1041-1054, 1977.
- 39.- Turman MA, Douvas A: A casein kinase type II (CKII)-like nuclear protein kinase associates with, phosphorylates, and activates topoisomerase I. *Biochem Mad Metab Biol* 50:210-225, 1993.
- 40.- Pommier Y, Kerrigan D, Hartman KD, et al: Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J Biol Chem* 265:9418-9422, 1990.

- 41.- Stojanov L, Satoh M, Dooley Ma, Kuwana M: Autoantibodies to topoisomerase I in a patient with systemic lupus erythematosus without features of scleroderma. *Lupus* 4: 314-317,1995.
- 42.- Boldyreoff B, Meggio F, Pinna L.A: And Issiger O. Protein Kinase CK2 structure-function, relationship: Effects of tehe B subunit on reconstitution and activity. *Cell Molec Biol Res* 40:391-399, 1994.
- 43.- Palmer DKO, Day K, Trong HL, Charbonneau H, Margolis RL: Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3734-3738,1991.
- 44.- Bjarne JB, Elmar G, Ole W: A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNAase I hypersensitive sites in tetrahymena R-chromatin. *Cell* 41: 541-551, 1985.
- 45.- Arndt R, Marion K: Histone H1 inhibits eukaryotic DNA topoisomerase I. *Fed Eur Bioch Soc* 294:125-128, 1991.
- 46.- Worrall JG, Snaith ML, Batchelor JR, Isenberg DA: SLE a rheumatological view. Analysis of the clinical features, serology and immunogenetics of 100 SLE patients during long term follow-up. *Q J Med* 74:319-330, 1990.
- 47.- Martínez C E: Antinuclear antibodies associated with pulmonary involvement in systemic sclerosis. *Chest* 96:960-961, 1989.
- 48.- Padilla TA, Martínez CE. Producción de topoisomerasa-I recombinante humana. XXV Jornadas Médico Quirúrgicas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. México, D.F, 31 de mayo al 5 de junio de 1993.
- 49.- Gioud M, Ait Kaci M, Monier JC: Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:407-413, 1982.
- 50.- Gussin HAE, Tselentis HN, Teodorescu M: Noncognate binding to histones of IgG from patients with idiopathic systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 96: 150-161, 2000.
- 51.- Gussin HAE, Russo KL, Teodorescu M: Effect of circulating immune complexes on the binding of rheumatoid factor to histones. *Ann Rheum Dis* 59: 351-358, 2000.
- 52.- Bernstein RM, Hobbs RN, Lea DJ, et al: Patterns of antihistone antibody

- specificity in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 28: 285-293, 1985.
- 53.- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield N, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277, 1982.
- 54.- World Medical Association: Declaration of Helsinki. Recommendation guide and doctors in clinical research. *World Med J* 11:281, 1964.
- 55.- Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD: A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br Med J* 2:732-739, 1957.
- 56.- Northway JD, Tan EM: Differentiation of antinuclear antibodies giving speckled staining pattern in immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol* 1:140-154, 1975.
- 57.- Hardin JA, Thomas JO: Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: localization of prominent autoantigens on histones H1 and H2B. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:7410-7414, 1983.
- 58.- Shoenfeld Y, Segol O. Anti-histone antibodies in SLE and other autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 7:265-71, 1989.
- 59.- Gussin HA, Elicha, Ignat E, Teodoresco VJ, Marius: Anti-topoisomerase I (Anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:376-383, 2001.
- 60.- Cohen MG, Pollard KM, Webb J: Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: prevalence, specificity, and relationship to clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 51:61-6, 1992.
- 61.- Ter Borg EJ, Horst G, Hummel E, Jaarsma D, Limburg PC, and Kallenberg CGM: Sequential development of antibodies to specific Sm polypeptides in a patient with systemic lupus erythematosus: Evidence for independent regulation of anti-double-stranded DNA and anti-Sm antibody production. *Arthritis Rheum* 31: 1563-1567, 1988.
- 62.- Frank CA, Robert GH, Marianne G Roebber, John BH, and Morris Reichlin: Increased frequencies of Sm and nRNP autoantibodies in american blacks compared to whites with systemic lupus erythematosus. *The J of Rheum* 15:12 1773-1776, 1988.

- 63.- Warlow RS, Gabriel U, McCluskey J, Kay PH, Christiansen FT & Dawkins RL: Extractable nuclear antigen (ENA) autoantibodies in SLE: an immunogenetic relationship with HLA, C4 and Bf alleles. *Clin Exp Immunol* 63:419-427, 1986.
- 64.- Ehrenstein MR, Swana M, Keeling D, Asherson, Hughes GRV, Isenberg DA: Anti-DNA antibodies in the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Brit J Rheumatol* 32:362-365, 1993.
65. Richter A, and Kapitza M: Histone H1 Inhibits eukariotic DNA topoisomerase I. *Fed of Eur Bioch Soc* 294:1, 2 125-128, 1991.
- 66.- Burdick G, Emlen W: Effect of antibody excess on the size, stoichiometry, and DNase resistance of DNA anti-DNA immune complexes. *J Immunol* 135:2593-2597, 1985.
- 67.- Tan EM. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol* 44:93-151, 1989.
- 68.- Arden LA, Groot, Els, R, de. & Feltkamp, T.E.W: Immunology of DNA III. *Crithidia luciliae* a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with immunofluorescence technique. *Ann NY Acad Sci* 254: 505-571, 1975.
- 69.- Brinkman K, Termat R, Berden JH, Smeenk RJ: Anti-DNA antibodies and lupus nephritis: the complexity of crossreactivity. *Immunol Today* 11:232-234,1990
- 70.- Vázquez AD, Pascual V, Zanetti M, and Rothfield NF: Analysis of human antitopoisomerase-I idiotypes. *J Clin Invest* 92:1302-1313.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones

1. Solución amortiguadora de carbonatos (0.05 M, pH 9.6)

Na_2CO_3 1.59 g

NaHCO_3 2.93 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 1 lt. Conservar a 4°C.

2. Solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 5.0)

$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$29.4 g

Disolver en agua dest. y ajustar el pH con ácido fosfórico antes de aforar a 1 lt.
Conservar a 4°C

3. Solución amortiguadora de fosfatos-salina (0.1 M, pH 7.2).

Solución A (0.2 M)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$27.6 g

Solución B (0.2 M)

Na_2HPO_4 anhidro28.4 g

Disolver cada una de las sales en agua destilada y aforar a 1 lt.

Mezclar:

Solución A.....165 ml.

Solución B.....335 ml.

NaCl74 g.

Agregar agua destilada y ajustar el pH con NaOH concentrada antes de aforar a 1 lt. Conservar a temperatura ambiente.

4. Solución amortiguadora de fosfatos-salina (0.01, pH 7.2)

Hacer una dilución 1:10 de la solución anterior con agua destilada y ajustar el pH.
Conservar a 4°C.

5. Solución amortiguadora de fosfatos-salina con Tween-20 al 0.05 %.

Tomar 100 ml de la solución 3 y adicionar agua destilada, posteriormente agregar 500 µl de Tween-20 y aforar a 1 lt, ajustando antes el pH a 7.2. Conservar a 4°C.

6. Acido sulfúrico 2.5 N. (Merck)

H₂SO₄ conc.....13.3 ml

Adicionar lentamente en agua destilada y aforar a 100 ml. Conservar a 4°C.

7. Sustrato de peroxidasa (Sigma) con O-fenilendiamina (Pharmacia)

C₆H₈N₂.....4 mg

H₂O₂.....5 µl

Amortiguador de citratos.....10 ml

Soluciones para electroforesis y para inmunoelectrotransferencia

8.- Monómero de acrilamida (solución madre) Bio-Rad

Acrilamida 30%30 g

Bis-acrilamida.....0.8 g

H₂O destilada.....c.b.p. 100 ml

Disolver en agua destilada, guardar a temperatura de 4°C no más de un mes.

9.- SDS 10% Bio-Rad

SDS.....10 g

H₂O destilada.....c.b.p. 100 ml

Disolver y guardar a temperatura ambiente.

10.- Persulfato de amonio.

Persulfato de amonio.....0.5 g

H₂O destilada.....5 ml.

Preparar al momento de usarse.

11.- Monómero de acrilamida al 4% (gel concentrador) (Bio-Rad)

H₂O deionizada.....3.05 ml
Tris pH 8.8.....1.25 ml
SDS 10%.....50 µl
Bis-Acrilamida (30% stock).....0.67 ml
Persulfato de amonio 10%.....25 µl
Temed.....5 µl

12.- Monómero de acrilamida al 20% (gel separador) (Bio-Rad)

H₂O deionizada.....0.75 ml
Tris pH 8.8.....2.5 ml
SDS 10 %.....100 µL
Bis-Acrilamida (30% Stock).....6.6 ml
Persulfato de amonio.....50 µl
Temed..... 5 µl

13.- Solución amortiguadora de electroforesis. (Bio-Rad)

(Tris-HCl 0.025 M p.H 8.8, 0.192 M glicina, 0.1% SDS)

Tris-HCl.....15 g
SDS.....50 ml de una sln. Al 10%
Glicina.....72 g
H₂O destilada.....c.b.p. 5 Litros
Disolver, ajustar el pH a 8.8 y filtrar.

14.- Solución para tratamiento de muestra para electroforesis.

(0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 2% solución de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol). (Bio-Rad).

Tris-HCl pH 8.8.....2.5 ml
SDS al 10%.....4 ml
Glicerol.....12 ml

EDTA.....7.4 mg
Pironina.....5 mg
H₂O.....c.b.p. 10 ml

15.- Solución amortiguadora para inmunoelectrotransferencia. (Bio-Rad)
(0.192 M glicina, 0.25 M Tris-HCl pH 8.3, 20% V/V Metanol)

Tris base.....12 g
Glicina.....58 g
Metanol.....800 ml
H₂O destilada.....c.b.p. 4000 ml
Homogeneizar y ajustar el pH a 8.35.

16.- Papel de Nitrocelulosa. Sigma.

Se cortaron tiras de 3mm de ancho, en las cuales se encontraba la proteína

17.- Soluciones para determinación de proteínas

Solución A

50 ml de Na₂CO₃ en NaOH 0.1N (J.T.Baker)
0.5 ml de tartrato de Na y K al 2% (J.T.Baker)
0.5 ml de CuSO₄.5H₂O al 1% (J.T. Baker)

Solución B

Reactivo de Folin-Ciocalteus 1:2
Estándar de Proteínas.
Albúmina bovina (Sigma)
Bovina (BSA).....100 µg/ml

ANEXO 2. Metodologías

Inmunofluorescencia indirecta

Es una técnica histoquímica y citoquímica para la identificación de antígenos o anticuerpos, elimina la necesidad de purificar y conjugar individualmente cada

muestra de suero, además aprovecha el fenómeno de fluorescencia, utilizando fluorocromos como fluoresceína y rodamina (tienen espectros de emisión y absorción) que se fijan con facilidad a las proteínas mediante enlaces covalentes a un pH alcalino. En este método para demostrar la presencia de un anticuerpo se utiliza una antiglobulina humana conjugada con el fluorocromo que al reaccionar pone en evidencia al anticuerpo ya fijado sobre el antígeno, lo cual se puede demostrar mediante la observación al microscopio de epifluorescencia cuya principal característica es emitir rayos UV los cuales excitan al fluorocromo produciendo una emisión de luz fácilmente observable.

Ouchterlony (Inmunodifusión)

Esta basada en la determinación visual de una reacción antígeno-anticuerpo, cuando ambos componentes se difunden en un medio semisólido (agarosa) y tienen la capacidad de formar complejos inmunitarios estables que se pueden analizar visualmente ó con ayuda de una fuente de luz opaca y en ocasiones una lupa ya que se producen líneas de precipitación características. Al usar sueros de referencia se puede identificar la especificidad de la reacción.

Determinación de Proteínas por el método de Lowry

Este método es uno de los más utilizados para la determinación de proteínas. Su realización se basa en la interacción inicial de la proteína con los iones de Cu^{++} en un medio alcalino. Esta reacción inicial forma un complejo inestable, y una reducción posterior de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno respectivamente.

En esta técnica, la reducción resultante es debida a la acción del complejo proteína- Cu^{++} que se generó inicialmente, lo que resulta en una reacción colorida, cuya lectura se debe realizar mediante un colorímetro.

Para llevar a cabo la determinación de proteínas se prepararon previamente las soluciones necesarias y se realizó una curva de calibración comparativa, empleando BSA comercial, como se anota a continuación:

Soluciones

Solución A

Solución B

Estándar de proteínas

ASB 100 µg/ml

Curva de calibración

No. de tubo 1 2 3 4 5 6 7

Condición	_____ ml _____					
Est. proteína	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Agua dest.	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
Sol. A (3ml)	_____					

Se mezclan los tubos y se deja reaccionar durante 10 min, a TA

Sol. B (0.3ml) _____

Los tubos se agitan y se dejan reaccionar durante 1 hr a TA y se leen en un colorímetro a 500 nm.

ELISA

Este método inmunoenzimático que puede tener distintos formatos, se basa en el empleo de un soporte, generalmente en fase sólida al cual se pueden acoplar antígenos o anticuerpos, optimizando esta unión con una solución de pH alcalino. En el ELISA directo se usa un suero o muestra en la que se desea conocer la presencia de su especificidad inmunológica. La identificación de la reacción se logrará al emplear un marcaje de anticuerpos con enzimas. De esta forma, los anticuerpos presentes en la muestra biológica son capaces de captar un antígeno

específico, que a su vez ser capaz de reaccionar con un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente.

Inmunoelectrotransferencia

Es uno de los métodos más usados para la detección de una proteína en una mezcla compleja, combina la resolución de la electroforesis en gel, la especificidad de los anticuerpos y la sensibilidad de una enzima. Consiste en la separación de una mezcla de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS, después de que una membrana de nitrocelulosa es puesta en contacto con el gel que contiene las proteínas separadas en condiciones donde la aplicación de un campo eléctrico permite que las proteínas sean transferidas a la membrana.

Cuando la membrana se incuba con una solución de un anticuerpo específico para la proteína de interés se forma un complejo conteniendo la proteína unida al anticuerpo. La membrana es revelada con una enzima unida a proteína "A" la cual por su afección por IgG humanas ó con antiglobulinas marcadas con enzimas, lo que permite identificar la banda que contiene a la proteína de interés.

ANEXO 4. Material biológico y su preparación

Sueros humanos : 65 sueros con diagnóstico de LEG.

Sueros Normales : 40 procedentes de Banco de Sangre.

Ambos sueros fueron tomados por punción venosa, centrifugados y congelados a -70°C hasta el momento de su uso.

Células Hep-2 . Laminillas procedentes de AFT-II System, Behring Calbiochem, La Jolla, Ca. USA.

Crithidia luciliae. Laminillas procedentes de AFT-III System Behring Calbiochem, La Jolla, Ca. USA.

Suspensión de ENA . Procede de ENA-I, II,III, Behring, Calbiochem, La Jolla, Ca. USA.

Albúmina bovina al 1% (Merck)
Albúmina bovina.....1g
PBS-tween estéril.....c.b.p. 100 ml.

Albúmina bovina al 3% (Merck)
Albúmina bovina.....3g
PBS-tween estéril.....c.b.p. 100 ml

Nucleohistona (Sigma)

La pureza de este antígeno se comprobó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (PAGE).

Nucleohistona.....20 mg
PBS 1X.....8.69 ml
Homogeneizar cuidadosamente hasta la disolución.

La concentración final quedó de 2.3 mg/ml

Solución de trabajo de Nucleohistona (s.t.NH) es de 20 mg/ml

Nucleohistona 2.3 mg/ml.....8.7 μ l
PBS-Tween-alb.....10000 μ l

Para una placa de 96 cavidades se requiere:

Nucleohistona (s.t.NH)83.48 μ l
PBS-Tween-alb.....9516.52 μ l

Homogeneizar perfectamente y adicionar 100 μ l a cada cavidad

Topoisomerasa-I Recombinante Topo-Ir

Fue obtenida a partir de una cDNA humano, (donado por el Dr. E. Durban, de la Universidad de Baylor) el cual fue insertado en el plásmido pT7-7 y expresado en la cepa XLI-blue de Coli.

La pureza de éste antígeno se comprobó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (PAGE).

Concentración original (Topo-Ir).....2.6 mg/ml

Solución de trabajo de Topoisomerasa-I R (s.t. Topo-I R) es de 20 μ l.

Topoisomerasa-Ir 2.6 mg/ml.....7.6 μ l
PBS-Tween-alb.....1000 μ l

Para una placa de 96 cavidades se requiere:

Topoisomerasa -Ir.....73.82 μ l (s. t)
PBS-Tween-alb.....9526.17 μ l

Homogeneizar perfectamente y adicionar 100 μ l a cada cavidad.

Anti-Inmunoglobulina Humana Acoplada a Peroxidasa (IgG*) (Sigma)

Dilución de trabajo de la IgG* :1:5000 la dilución se hace con PBS-Tween-alb.

Proteína "A" unida a peroxidasa. Bio-Rad.

4 cloro 1 naftol revelador. Sigma.

ANEXO 5. Equipo empleado durante el trabajo de tesis

Microscopio de Epifluorescencia Carl Zeiss.

Microplacas Costar.

Lavador de Microplacas Nunc Cell Harvester 8.

Estufa Boekel.

Pipetas automáticas graduables de 10,20, 100, 200 y 1000 μ l.

Lector de Elisa Labsystems Mutiskan MS.

Equipo para electroforesis (inmunolectrotransferencia).

Equipo para inmunotransferencia.

Pipetas y charolas para tinción de geles.

ANEXO 6. FORMATO DE ACEPTACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACION "ANTICUERPOS ANTI-NUCLEOHISTONAS Y SU RELACIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-TOPOISOMERASA-I EN LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG)".

A QUIEN CORRESPONDA:

Yo _____

Acepto voluntariamente participar en el estudio "ANTICUERPOS ANTI-NUCLEOHISTONAS Y SU RELACIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-TOPOISOMERASA-I EN LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG)", que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y CMN "20 de Noviembre" del ISSSTE. Acepto que, como parte del estudio se me realice una toma de muestra de sangre periférica, cuyos procedimientos, utilidad y riesgos se me han explicado con anticipación.

Entiendo que tengo la libertad de no aceptar este procedimiento si así lo concidero conveniente. En caso de que esto suceda la calidad de atención médica dentro de este instituto no se verá afectada.

Firma de aceptación _____ Fecha _____

Testigo _____ Testigo _____

ANEXO 7. CEDULA DE RECOLECCION DE DATOS.

Nombre _____ Exp _____ Diagnóstico _____

Edad _____ sexo _____ Domicilio _____

_____ teléfono _____

Fecha de ingreso _____ Fecha actual _____

Lugar de origen _____ Lugar de residencia _____

Desde cuando _____ Otras residencias _____

Estrato social: alta, media alta, media baja, baja.

Ocupación actual _____ Desde cuando _____

ANTECEDENTES HEREDITARIOS Y FAMILIARES: Alergias (si) (no)

Reumáticas (si) (no) Diabetes (si) (no) CA (si) (no)

Asma (si) (no) HAS (si) (no)

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS:

Contacto con aves (si) (no)

Contaminantes alergénicos _____

Desde cuando _____ hasta cuando _____

Contaminantes no alergénicos: Tabaco pasivo, activo, negativo.

Hasta cuando _____ paquetes por año _____

Leña: (si) (no), desde cuando _____ hasta cuando _____

Carbón: (si) (no) desde cuando _____ hasta cuando _____

Ventilación: Buena Mala Regular

Polvos inorgánicos: _____

Desde cuando _____ hasta cuando _____

Grado: muy estrecho escaso no

Gases, humos y vapores _____

Desde cuando _____ hasta cuando _____

Grado: muy estrecho escaso no

OFICIOS PREVIOS (ESPECIFICAR FECHAS) _____

PERSONALES PATOLÓGICOS: Enlistar enfermedades con fechas _____

Transfuciones: (si) (no) fecha _____

Homosexualidad; (si) (no) Bisexualidad (si) (no) Toxicomanías (si) (no)
_____ desde cuando _____ hasta cuando _____

Gineco-Obstétricos: Gestaciones _____ Para _____ Abortos _____
C _____ Fup _____ Fur _____

PADECIMIENTO ACTUAL:

Tiempo de evolución (meses) _____ Disnea: pequeños, medianos, grandes
esfuerzos, ortopnea.

Tos: (si) (no) Expectoración (si) (no) escasa mediana abundante

Aspecto: mucoso, mucopurulento, purulento, hemoptico, sibilancias (si) (no)

Dolor toraxico: sitio _____

Tipo _____ desde cuando _____ radiación _____

Desencadenantes _____

paliativos _____

Pérdida de peso (Kg) _____ en cuanto tiempo _____

Anorexia (si) (no) Astenia (si) (no) Adinamia (si) (no) Fiebre

°C _____ desde cuando _____ hasta cuando _____ tipo _____

Agudización de síntomas con agentes externos (si) (no)

Lipotimias (si) (no) desencadenantes _____

Palpitaciones (si) (no) desencadenantes _____

_____ frecuencia por día _____

APARATOS Y SISTEMAS _____

EXPLORACION FISICA

Peso _____ talla _____ Sup corp _____ TA _____ Fc _____ Fr _____ PA _____

Uso de músculos accesorios (si) (no) Cianosis (si) (no) Hipocratismo(si) (no)

Índice digital _____ Estertores (si) (no) crepitantes, subcrepitantes, rientes
roncantes, sibilantes, supraescapular, interescapular, subescapular.

Intensidad 1 2 3 síndromes (si) (no) tipo _____ localización _____

Arritmia (si) (no) desdoblamiento (si) (no) Tipo: Fisiológico Patológico

Paradójico, sitio _____ chasquido (si) (no)

Datos de insuficiencia ventricular derecha (si) (no) _____

Otros datos generales anormales _____

PARACLINICOS

BH: Hto _____ HB _____ VSG _____ Leucos _____ L _____ N _____ B _____ E _____

M _____ Bandas _____ Juv _____ Metam _____ Plaquetas _____

Q:S: Normal o _____

EGO Normal o _____

Latex (+) (-) Prot. C react _____ AAL _____ Ac Acantin _____ Ag aviario _____

Radiología: Zona afectada: 1 2 3 ; Imagen predominante: Exudativa Nodular

Reticulo nodular Reticular Panal de aveja

Longitud _____ Diámetro transverso _____ Diámetro AP _____ Diámetro de art.

pul _____ Índice cardio-torax. _____ Angulo costodiafragmático _____ Angulo post _____

Trama: Normal Disminuida Aumentada

PRUEBAS FUNCIONALES

CPT _____ CV _____ VR _____ DpD _____ DpD/DpE _____ PRE _____

Hiperreactividad (si) (no) _____

PaO₂: R _____ E _____ O₂

PaCO₂ R _____ E _____ O₂

PH R _____ E _____ O₂

HEMODINAMIA:

ECG: NORMAL ANORMAL _____

Todos los siguientes datos antes y después oxígeno.

Consumo de O₂ _____, _____ FC _____, _____ PMAD _____, _____

PDV: Sist _____, _____ Diast _____, _____ Med _____, _____

P Art. Pul: Sist _____, _____ Gasto Card _____, _____

PCP: _____, _____ Vol. Latido _____, _____