

2 Ej No. 54



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**ANTICUERPOS ANTINUCLEARES SERONEGATIVOS EN EL LUPUS  
ERITEMATOSO GENERALIZADO DETERMINACION EN LIQUIDOS  
CORPORALES**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a

**GENARO JIMENEZ REYES**

México, D. F.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## I N D I C E

|                      | Pág. |
|----------------------|------|
| INTRODUCCION         | 1    |
| ANTECEDENTES         | 4    |
| MATERIALES Y METODOS | 12   |
| RESULTADOS           | 22   |
| CONCLUSIONES         | 33   |
| BIBLIOGRAFIA         | 40   |

## INTRODUCCION

El sistema inmune es extremadamente complejo y es una de las diferentes formas en que el organismo se da a la tarea de -- mantener la homeostasis y la salud. En este sistema los componentes genéticos, celulares y moleculares se combinan en -- una red de complejas comunicaciones, que en su interacción, dan por resultado el control y regulación de la respuesta -- inmune. En el humano existen múltiples padecimientos que están asociados a trastornos de la respuesta inmune: la auto-- inmunidad es un fenómeno inmunológico que se caracteriza por el desarrollo de autoanticuerpos contra autoantígenos. Las -- enfermedades autoinmunes son el resultado, al parecer, de un gran espectro de anormalidades genéticas e inmunológicas que a su vez interaccionan con factores exógenos (virus, bacterias) y endógenos (hormonas, anormalidades genéticas). Las -- enfermedades autoinmunes pueden ser clasificadas dependiendo del cuadro clínico que presenten en: enfermedades organoespe-- cíficas, las cuales son el resultado de respuestas anormales dirigidas contra antígenos que se encuentran confinados en -- un órgano en particular (por ejemplo anticuerpos contra tiro globulina y componentes microsómicos de la tiroides en la -- tiroiditis de Hashimoto), y las enfermedades órgano-no espe-- cíficas, las cuales se caracterizan por una respuesta autoin-- mune dirigida contra determinantes antigénicas propias, presentes en diferentes órganos (por ejemplo los anticuerpos di-- rigidos contra determinantes de membrana basal en el lupus -- eritematoso generalizado).

Muchos de los padecimientos reumatológicos son de naturaleza autoinmune; el lupus eritematoso generalizado es un trastor-- no inflamatorio generalizado que puede afectar a diversos -- órganos y sistemas, de curso variable y de etiología descono-- cida. Sus síntomas se piensan que sean secundarios al atrapa-- miento de complejos antígenos anticuerpo en los capilares de las estructuras viscerales. Se ha considerado que en la for--

mación de los complejos inmunes participan los anticuerpos antinucleares (AAN), y con ello es posible evaluar el estado clínico y pronóstico del paciente, dando bases en la observación de los estados clínicos (lupus discoide, nefritis, estados patológicos en el sistema nervioso central etc), cambios patológicos (enfermedad renal focal vs difusa, membranosa vs proliferativa) y en los hallazgos en el laboratorio (la presencia de anticuerpos anti-sm). Los complejos inmunes formados por ADN-anti-ADN tienen un importante papel en la inmunopatogénesis de la nefritis en el lupus eritematoso generalizado (LEG) (1,2). Existe correlación entre la presencia de anticuerpos anti-ADN con la presencia de nefritis, y los niveles de anticuerpo estimado por diferentes métodos, puede ayudar a establecer la actividad de la enfermedad a un tiempo dado. Se han observado diferentes formas de nefropatía, como la glomerulonefritis proliferativa que puede estar asociada a síndrome nefrótico y a insuficiencia renal y que constituye uno de los mayores peligros para la vida del paciente con LEG, la nefritis focal o mesangial que es habitualmente benigna pero que ocasionalmente puede progresar, y un tercer tipo, la glomerulonefritis membranosa que está asociada con proteinuria profusa, y síndrome nefrótico, que tiende a progresar muy lentamente. La presencia de los anticuerpos antinucleares en suero es generalmente considerada como signo diagnóstico decisivo de LEG (3). Existen reportes según los cuales la presencia de los AAN se encuentra invariablemente en pacientes no tratados con LEG (4-8); sin embargo, en algunos se ha descrito un porcentaje pequeño de ellos (aproximadamente al 15%) que presentan AAN negativos (9-15), los cuales a su vez han sido clasificados de acuerdo con los criterios establecidos por la Asociación Americana de Reumatismo (AAR).

El propósito del presente estudio es el de tratar de establecer uno de los posibles mecanismos por los cuales se pudiera explicar la seronegatividad de los AAN en pacientes con LEG,

efectuando un análisis en líquidos corporales de pacientes con lupus y AAN negativos en suero, con proteinuria importante (0.5 g/l) y/o derrame de líquidos en cavidades así como con compromiso del SNC, y con esto establecer una correlación entre su ausencia en suero con la presencia en otros líquidos corporales.

## ANTECEDENTES

El descubrimiento de la célula LE (16) y la introducción de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (17), dieron origen a estudios de anticuerpos dirigidos contra diferentes componentes nucleares (18), los cuales se efectuaron en una gran variedad de enfermedades del tejido conjuntivo (19). Las enfermedades del tejido conjuntivo presentan manifestaciones clínicas heterogéneas y tienen diversos grados de severidad en los diferentes órganos y sistemas implicados. El lupus eritematoso generalizado (LEG) es el prototipo de enfermedad autoinmune con muchos órganos y sistemas afectados: piel, articulaciones, riñones, sistema nervioso central, membranas serosas, pulmones, corazón y sistema músculo esquelético, los cuales son potencialmente susceptibles a desarrollar un proceso patológico.

La nefritis en el LEG es considerada como un buen ejemplo de lesión por complejos inmunes: varios sistemas Ag-Ac juegan un papel en la patogénesis de las lesiones del tejido renal. Tienen particular importancia los anticuerpos que son reactivos a ADN nativo, ya que no sólo tienen un diagnóstico específico sino que desempeñan un importante papel en la formación de complejos inmunes del tipo ADN-anti-ADN. Se han observado otros sistemas relacionados con la nefritis lúpica, como son los anticuerpos contra ADN desnaturalizado y anti-Ro; los anticuerpos a ADN se han encontrado en la circulación, crioprecipitados, lesiones renales y eluidos renales; similarmente se han encontrado en eluidos renales concentraciones elevadas de anticuerpos anti-Ro obtenidos de pacientes con glomerulonefritis lúpica. Se ha encontrado en pacientes con LEG y AAN-negativos la presencia de anticuerpos anti-Ro, 62% (20) y 50% (10); en estos trabajos se sugiere que pueden ser marcadores serológicos para padecimientos sistémicos con dermatitis clásica de lupus y quienes además son AAN-seronegativos. En el estudio efectuado por Gladman y col. (10) la población manejada es pequeña, pudiendo generar con interpretaciones erróneas.

En el trabajo efectuado por Madisson y col. (20) de los 66 - pacientes AAN-negativos que estudiaron, 42 de ellos no tienen los 4 criterios establecidos por el AAR y los 24 pacientes -- restantes, que sí llenan dichos criterios, no fueron descritos por separado del grupo total y con ello se pudo modificar la - información real de los datos encontrados en lo que podría ser una clase o subgrupo de pacientes con LEG y AAN-negativos. En el análisis de estos pacientes seronegativos con lupus es posible establecer otras posibles causas que expliquen la seronegatividad, que a continuación revisaremos.

Una de ellas es que estos pacientes en realidad tengan LEG; es generalmente aceptado que pacientes con posible LEG que tengan 4 o más criterios establecidos por el AAR se diagnostiquen como lupus. Wolf y col. (21) encuentran en su trabajo que de 100 mujeres normales estudiadas ninguna de ellas llena los cuatro criterios mencionados. De no ser LEG lo que presentan estos -- pacientes, ¿qué otra enfermedad se podría postular?. Al revissar la literatura se observa frecuentemente la existencia de - pequeños grupos de LEG-AAN-negativos, en estudios de pacientes que son clasificados por los datos clínicos como LEG; Pollak - (22) reporta 9, de 112 pacientes, con AAN negativos usando como sustrato células de mucosa bucal y a una dilución del suero de 1:4 y mas adelante el mismo, sumando a otros estudios encuentra un 7% de 274 pacientes con AAN-negativos: Leonhardt (23), - reporta un 4% de 71 pacientes con LEG-seronegativos, Zweiman y col. (24) reporta correlaciones clínico-patológicas entre pacientes con nefritis por lupus y 7% de 28 pacientes tienen persistentemente AAN-negativo; Estes (11) reporta 13% de 150 pacientes; Bartholomew (25) observa que 5 de sus 121 pacientes - con LEG son AAN-negativos; Lee y col. (13) encuentra 5 pacientes seronegativos de 110; Fries y col. (12) reporta un 2% con AAN-negativo; De Freitas (14) 36% con AAN-negativo; Donadio -- (9) 22% con AAN-negativo; Gladman (10) encuentra 5% con LEG-AAN negativo y Ruthschild (15) reporta un 19% de pacientes LEG-AAN-seronegativos. Como se puede apreciar, varios investigadores -- han encontrado en sus estudios de pacientes con LEG, subgrupos

que son AAN-negativos y que en el inicio del estudio se consideran pacientes con sintomatología característica de LEG. (VER TABLA 1).

Otra de las posibles causas que pudieran explicar la no presencia de AAN en pacientes con LEG podría ser el uso de una técnica inadecuada; sin embargo, es experiencia común que la reacción de los AAN por inmunofluorescencia (IFL) es sensible, y el problema mas bien aqueja a la interpretación de falsos positivos que a la de falsos negativos; además, la frecuencia con que estos pacientes presentan AAN-negativos es elevada, descartando errores técnicos en el laboratorio.

El fenómeno de prozona puede ocurrir en muchas de las técnicas inmunoserológicas para la detección de anticuerpos y la IFL in directa no esta exenta de ello; en el estudio efectuado por -- Ritche (26) estudia por inmunofluorescencia el fenómeno de pro zona, observó una tinción nuclear de baja intensidad en sueros de 12 pacientes con padecimientos reumáticos, los cuales fueron diluídos para el examen de 1:4 a 1:8, también encontró que 40 de 60 sueros no diluídos de individuos normales presentaban resultados positivos, para estos resultados a la fecha no han sido confirmados. Alexander y col. (27), Seligman y col (28) y -- Parker (29) efectuaron pruebas de AAN que sumadas dan un total de 3,353 sueros probados, de personas con enfermedades del tejido conectivo, con dilución y sin diluir, no encontrando el fenómeno de prozona. Además, Fessel (30), Provost (31), Madison (20) y Ruthschild (15) quienes estudiaron pacientes con LEG y AAN-ne gativos, dan evidencia de no tener efecto de prozona en sus de terminaciones.

Existe la posibilidad de que los pacientes LEG-AAN-negativos es ten formando complejos inmunes. Blomjourns y Feltkamp (32) sugie ren que en algunas circunstancias los AAN pueden estar formando complejos inmunes que generen su negatividad en suero al anali zarlos por los métodos convencionales; ellos encontraron que en

TABLA 1

AAN-NEGATIVOS EN LEG

| AÑO  | AUTOR (NUMERO DE REFERENCIA.) | NUMERO DE PACIENTES CON LEG | % LEG CON AAN-NEGATIVOS | METODO DE DETERMINACION DE AAN. |
|------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1964 | POLLAK (22)                   | 270                         | 7                       | IFL                             |
| 1964 | LEONHARDT (23)                | 71                          | 4                       | IFL                             |
| 1968 | ZWEIMAN (24)                  | 28                          | 7                       | CELULA LE y FACTOR ANTINUCLEAR  |
| 1971 | ESTES Y CHRISTIAN (11)        | 150                         | 13                      | CELULA LE y FACTOR ANTINUCLEAR  |
| 1974 | BARTHOLOMEW (25)              | 121                         | 4                       | IFL                             |
| 1977 | LEE y COL. (13)               | 110                         | 4                       | IFL                             |
| 1977 | FRIES Y COL. (12)             | 112                         | 2                       | IFL                             |
| 1977 | DEFREITAS (14)                | 103                         | 36                      | IFL                             |
| 1977 | DONADIO Y COL. (9)            | 28                          | 22                      | IFL                             |
| 1978 | GLADMAN (10)                  | 153                         | 10                      | IFL, RIA ANTI ADN, OUCHTERLONY  |
| 1983 | RUTHSCHILD (15)               | 52                          | 19                      | RIA ANTI ADN, CIEF, IFL         |

IFL- INMUNOFLUORESCENCIA  
 RIA- RADIOINMUNOANALISIS  
 CIEF-CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

## TABLA 2

POSIBLES EXPLICACIONES DE LA NEGATIVIDAD  
DE AAN EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE -  
LEG.

---

- 1.- POSIBILIDAD DE QUE SE TRATE DE OTRO PADECIMIENTO.
  - 2.- AAN NEGATIVOS EN SUERO DE PACIENTES CON LEG DEBIDO A:
    - 2.1 TECNICA INADECUADA
    - 2.2 FENOMENO DE PROZONA
    - 2.3 COMPLEJOS INMUNES
    - 2.4 ANTICUERPOS ABSORBIDOS EN TEJIDOS
    - 2.5 SUSTRATO ANTIGENICO NO APROPIADO
    - 2.6 PASO DE ANTICUERPOS HACIA OTROS LIQUIDOS CORPORALES.
-

5 pacientes con datos clínicos de LEG pero AAN negativos, al disociar los posibles complejos inmunes por diálisis con un -- amortiguador ácido, y luego de irradiar con luz uv para después ajustar a pH de 7.2, se volvieron positivos. La formación de -- complejos inmunes predispone a estados patológicos del paciente, como lo son padecimientos reumáticos, hematológicos y renales, en el laboratorio el suero es anticomplementario, la fijación -- de ciq es positiva y las fracciones de complemento  $C_3, C_4$  disminuyen, de esta manera los AAN-negativos en el suero correlaciona con el estado clínico del paciente.

Otra de las posibilidades que pueden explicar los estados de -- seronegatividad es que los anticuerpos antinucleares son adsorbidos en los órganos, en especial piel y/o riñón: Prystowsky y col. (33) encontraron en pacientes con afecciones cutáneas crónicas y LEG sin otros datos clínicos que solo el 4% de 80 pacientes tuvieron pruebas positivas para AAN y en estudios posteriores 1 de los 80 pacientes tenía anticuerpos a ADN nativo, a 17 pacientes se le hizo IFL de una biopsia de la lesión y 13 (77%) de estos tuvieron resultados positivos, y a 31 de los pacientes del estudio, se les efectuó IFL en biopsias de piel -- normal y no se encontraron pruebas positivas; esto indica que los anticuerpos se presentan sólo en el sitio de la lesión y -- sin evidencia de que estos sean AAN. Wertheimer and Barland -- (34) demostraron que los inmunodepósitos presentes en piel y -- riñón no están relacionados y representan procesos independientes; además, encontraron una correlación no significativa entre la presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-ADN nativo y la IFL positiva en piel. Koffer y col. (35) en un examen efectuado en un paciente, al examen microscópico de autopsia de riñón no encontrará glomerulonefritis activa, y el estudio del eluido glomerular reveló anticuerpos anti-ADN nativo que estuvieron persistentemente ausentes en suero. Appel y Col. (36) reporta a un paciente con datos clínicos de LEG: lupus discoide, úlceras -- orales. alopecia y artritis no deformante, en la biopsia renal -- se encontró nefropatía membranosa e IFL positiva en la lesión, -- con anticuerpos contra las determinantes anticitidina, y las cé-

lulas LE y los AAN resultaron negativos en su suero. Svec y col. (37) observaron correlación entre las clases de anticuerpos unidos al glomérulo y los títulos de anticuerpos de la misma clase presentes en suero: Krishnan y Kaplan (38) han reportado correlación entre la presencia de la actividad antinuclear en los eluidos de riñones y los niveles de AAN en suero. De estos resultados podemos observar que la adsorción de anticuerpos en piel es en zonas limitadas, donde se encuentra la lesión, y no existe correlación con otras lesiones donde ocurre la adsorción de anticuerpos como lo es riñón. Además, existe controversia sobre la relación de inmunodepósitos y el hallazgo de anticuerpos en suero. Los resultados de inmunodepósitos de riñón son únicos y aislados aunque revelan datos que en los pacientes encontrados podrían explicar la ausencia de AAN en suero.

Existen reportes que sugieren la existencia de una correlación entre los niveles de inmunoglobulinas presentes en suero, el metabolismo de éstas y los estados de nefropatía de los pacientes con LEG; Levy y col. (39) encontraron una disminución en la síntesis y un aumento en el catabolismo de las Igs. Giangia como y col. (40) encontraron una disminución de Igs en suero, en especial IgG e IgA en síndrome nefrótico. Existen varios reportes que sugieren que la depuración de IgG correlaciona con los títulos de anticuerpos en suero con hallazgos de AAN en orina (41-43). Presvellin y Takeuchi (43) encontraron AAN en orina y líquido pleural en un paciente con LEG que en repetidas ocasiones había tenido AAN negativos. El paciente de este estudio presentaba una concentración elevada de Igs en orina y líquido pleural y si esto ocurre a su vez con un decremento en la síntesis de Igs puede provocar una disminución efectiva de AAN en suero generando de esta manera una prueba falsa negativa.

Finalmente Meryhew y col (48) efectuaron un estudio de las clases de AAN en orina de pacientes con LEG y esclerosis sistémica progresiva (ESP) encontrando en un elevado porcentaje de ellos

AAN en orina de diferentes clases (sm, RNP, DNAN, centromero, SS-A), que correlacionan con la proteinuria del paciente en el 62% de los casos, encontrándose inclusive AAN en orina en aquellos en que la función renal aparentemente se encontraba normal y esto pudiera ser signo de una alteración en la permeabilidad de membranas capilares.

## MATERIALES Y METODOS

## OBTENCION DE MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de orina y suero de 32 pacientes con lupus eritematoso generalizado, 22 de ellas con proteinuria y 10 sin proteinuria, 7 muestras de líquido cefaloraquídeo (LCR) y suero de pacientes con LEG que presentaban manifestaciones neurológicas; una muestra de líquido de ascitis y suero de un paciente con LEG que presentó pérdida de líquido debido a trastornos hepáticos con ascitis y una muestra de líquido pericárdico y suero de un paciente con pericarditis. Como grupos control se recolectaron orina y suero de 10 pacientes con proteinuria que no padecían LEG, ni ninguna otra enfermedad del tejido conectivo, así como de 10 sujetos sanos. Varios de los pacientes con lupus recibían esteroides al momento de la recolección.

## PREPARACION DE LOS CONCENTRADOS DE ORINA

Se recolectó la primera orina de la mañana de cada uno de los pacientes estudiados. Se probó la presencia de proteinuria por medio de la tira reactiva "bililabstix" y se le añadió azida de sodio (0.01 mg por ml de orina) como preservador guardándose a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las orinas se concentraron por ultrafiltración con tubos de tamaño de pro para paso de moléculas de peso molecular mayor a 3500 a vacío, concentrando 10 veces el volumen original de la orina.

Las orinas así concentradas se dializaron contra amortiguador salino de fosfatos  $\text{pH}=7.2$  y fueron utilizadas sin diluir en las técnicas.

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES: Radioinmunoanálisis anti-ADN  
[técnica de Farr]

METODO:

- 1.- En un tubo de 13 x 100 mm se colocan 0.2 ml de suero y se descomplementa a 56 °C 30 min. en baño maría.
- 2.- Se colocan 50 microlitros de suero en otro tubo que contiene 0.45 de amortiguador de boratos (dil. 1:10), mezclar.
- 3.- Se toman 50 microlitros de la dilución del suero 1:10 y se colocan en un tercer tubo de 12 x 75 mm de vidrio.
- 4.- Se agregan a cada tubo con suero diluido, 50 microlitros de ADN marcado con carbono catorce; mezclar.
- 5.- Tapar los tubos e incubar 1 hora a 37 °C.
- 6.- Posteriormente se dejan a 4 °C toda la noche.
- 7.- A la mañana siguiente se colocan los tubos en hielo y se les agregan 100 microlitros de solución saturada de sulfato de amonio. Mezclar y dejar en frío 1 hora.
- 8.- Centrifugar a 4 °C por 45 minutos a 1200 g .
- 9.- Para cada muestra de suero estudiada, marcar dos viales de centelleo: P (precipitado) y S (sobrenadante).
- 10.- En el vial marcado con S colocar 0.9 ml de amortiguador de boratos.
- 11.- Usando puntas descartables de micropipetas, retirar cuidadosamente 100 microlitros de sobrenadante y ponerlos en el vial correspondiente.
- 12.- Lavar el resto del contenido de cada tubo con 0.9 ml de amortiguador de boratos, mezclar y transferirlo con pipetas Pasteur al vial marcado con P.
- 13.- Agregar 10 ml de líquido de centelleo. Enfriar a 4 °C por 15 minutos.

14.-Contar de 2 a 4 minutos en un contador beta y obtener el porcentaje de captación de acuerdo con la siguiente relación:

$$\frac{\text{cpm precipitado} - \text{cpm sobrenadante}}{\text{cpm precipitado} + \text{cpm sobrenadante}} \times 100 = \% \text{ captación ADN}$$

MATERIAL:

- amortiguador salino de boratos                    -líquido de centelleo(Bray)
  - pH = 8.0    0.055M:                                    120 g de naftaleno
  - 500 ml de ác. bórico 0.2M                            8g de PPO
  - 49 ml de borato de sodio 0.2M                      0.8g de POPOP
  - 11.68 g de cloruro de sodio                        200 ml de metanol
  - aforar a dos litros con agua                      40 ml de etilenglicol
  - destilada.    Aforar a 2 litros con
  - 1,4-dioxano y guardar
  - en frasco obscuro.
  
- solución saturada de sulfato de amonio.
  - Pesar 575g de sulfato de amonio y agragar lentamente a un litro de agua destilada calentar la solución y disolver - completamente la sal y filtrar en caliente. Dejar enfriar.
  
- ADN timidina  $^{14}\text{CH}_3$ .
  - El ADN debe diluirse de acuerdo con las instrucciones del frasco. La cantidad de ADN que ha de usarse por tubo en la tecnica de Farr debe de ser de 0.1 microgr,os de ADN- $^{14}\text{C}$ - contenido en 50 microlitros.
  - Reactivo suministrado por New England Nuclear Nec-687 Deoxy-ribonucleic acid thimine-methyl  $^{14}\text{C}$ .
  - Actividad específica 1.4 microCi/OD 260 en 0.5 ml.

Pureza Química:  $260/280 = 1.89$ , actividad al precipitar con TCA 10%, 98.3%, conteniendo ADN desnaturalizado por tratamiento con nucleasa S1, 1.4%.

**Nota:**

Las muestras de orinas sin concentrar y concentradas no se diluyeron 1:10 para efectuar el análisis.

**ANTICUERPOS ANTINUCLEARES: Inmunofluorescencia indirecta**

En este método se utilizan dos tipos de sustratos: Un hemoflage lado, *Crithidia luciliae*, el cual posee una gran mitocondria diferenciada que contiene ADN circular nativo denominado cinetoplasto, en donde su ADN se encuentra libre de histonas u otros antígenos nucleares (Arden y col.) El otro sustrato utilizado son cortes de riñón e hígado de rata de 4 micras de espesor, en la identificación de otros anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos nucleares que se asocian a diferentes patrones de inmunofluorescencia.

**Método:**

Dilución de la muestra: Preparar una dilución 1:10 de la muestra de suero con amortiguador de fosfatos salino (0.1 ml de muestra más 0.9 ml de AFS)

- 1.- Si los sustratos se encuentran congelados ponerlos a temperatura ambiente y en una cámara húmeda.
- 2.- Cubrir el sustrato utilizando la muestra diluída (aprox. 25 microlitros) e incubar en la cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Una vez transcurrido este tiempo sumergir las preparaciones en cajas de Coplin, con amortiguador salino de fosfatos efectuando dos cambios de 10 minutos. c/u.
- 4.- En seguida de los lavados colocar las preparaciones en la cámara húmeda y cubrirlos con anti-gamma globulina humana

conjugada con isotiocianato de fluoresceína e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

5.- Efectuar lavados al igual que en paso 3.

6.- Examinar las laminillas en microscopía de fluorescencia a 400X y anotar los resultados.

**Material:**

Sustrato de *Crithidia luciliae*, obtenido de Calbiochem-Behring como AFT System II, número de catálogo 879050.

Sustrato de cortes de tejido renal y hepático de rata preparado en el laboratorio donde se efectuó el trabajo.

Anti Ig/IgG+IgA+IgM humana (cadenas H+L) preparada en cabra y el fluorocromo en una relación molar F/P =  $2.5 \pm 1.5$ , producida por Instituto Behring con núm. de catálogo OKTG F96 00075.

Amortiguador salino de fosfatos pH 7.2

8.5 g de NaCl + 6.8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 2.48g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en un litro de agua destilada.

NOTA: Para el análisis de orina (ya sea concentrada o no concentrada) no se efectuó la dilución previa 1:10. Se usó directamente.

DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL: Método de Folin y Ciocalteu. (Greenberg, J. Biol, 82, 545 - 1924).

**Método:**

1.- Pipetear dentro de un pequeño tubo de ensayo seco:

1 ml de suero y

9 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9%

mezclar.

2.- Pipetear dentro de un frasco volumétrico de 50 ml 2 ml del suero diluido.

- 3.- Añadir al frasco 25 ml de agua destilada.
- 4.- Añadir 2 ml de solución de hidróxido de sodio 5N.
- 5.- Añadir lentamente y con agitación constante del frasco, 3 ml de reactivo de fenol,
- 6.- Aforar con agua destilada hasta graduación. Mezclar.
- 7.- Dejar en reposo a temperatura ambiente 5 minutos.
- 8.- Leer en cubeta cuadrada de 1 cm a 460 nm contra agua destilada como blanco.
- 9.- Determinar en tabla de calibración la concentración en gramos por 100 ml de suero.

MATERIAL:

- solución de NaOH 5N.  
20g de NaOH disolver en 80 ml de agua destilada aforar a 100 ml.
- solución de cloruro de sodio al 0.9%.  
pesar 0.9 g de Na cl y disolver en 100 ml de agua destilada.
- Reactivo de fenol.  
Suministrado por Sigma de México para manual de trabajo en aparatos Leitz.

Técnica obtenida del manual de tablas de calibración para el uso del colorímetro Leitz serie no. 37470.

## CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS . Nefelometría - laser.

METODO:

- 1.- Efectuar diluciones del suero 1:10, 1:100 y 1:1000, con solución salina filtrada al 0.85%.
- 2.- Colocar en celdas para nefelometría, dependiendo lo que se va a determinar, en los carros respectivos:  
  
Para IgG  
10 microlitros de la dilución 1:1000  
  
Para IgA  
100 microlitros de la dilución 1:100  
  
Para IgM  
100 microlitros de la dilución 1:100
- 3.-Agregar el antisuero correspondiente 200 microlitros y agitar suavemente.
- 4.-Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- 5.- Previa operación de las curvas de calibración, efectuar las lecturas en el nefelómetro laser (Behring).
- 6.- Obtener los resultados correspondientes de la tornamesa de -- operación (Hewlett Packard).

MATERIAL:

-antisueros LN

obtenidos de Química Hoechst de México de conejo.

anti-IgG (cadena gama) OSAS 04/05 0.42 mg/ml.

anti-IgA (cadena alfa) OSAR 04/05 0.28 mg/ml.

anti-IgM (cadena mu) OSAT 04/05 0.86 mg/ml.

-solución de NaCl al 0.85%

Disolver 0.85g de NaCl en 100 ml de agua destilada.

- Nefelómetro -laser, Behring Institut.
- Tornamesa Hewlett Packard modelo 9815A.
- Celdas de nefelometría-laser obtenidas de Química Horchst de México con número de catálogo OVEI 04/05.

Nota:

Las muestras de orina se utilizaron sin diluir en la determinación y se centrifugaron 10 min. a 1200g.

ADSORCION DE INMUNOGLOBULINAS:

Las inmunoglobulinas con actividad antinuclear fueron aisladas de la orina concentrada por adsorción con núcleos de timo de ternera. Los núcleos aislados se expusieron a los concentrados de orina a 37°C por una hora y posteriormente toda la noche a 4°C. Los núcleos fueron centrifugados y lavados con salina en frío repetidas veces. Posteriormente se expusieron los núcleos a una solución de DNasa que contenía 0.4 mg de DNasa por ml y se les dejó por una hora a 37 °C para su digestión. Los núcleos digeridos se centrifugaron y el sobrenadante fue dializado contra salina. Los anticuerpos con actividad antinuclear aislados fueron probados por las técnicas ya descritas.

## RESULTADOS

### Pacientes con LEG y AAN negativos en suero.

De los 32 pacientes analizados 16 fueron negativos en suero - por inmunofluorescencia (12 de ellos con proteinuria y 4 sin proteinuria), 19 por captación de ADN (13 con proteinuria y 5 sin proteinuria), 24 por Crithidia luciliae (16 con proteinuria y 8 sin proteinuria); de ellos fueron positivos en orina uno por inmunofluorescencia, 3 por captación de ADN y - ninguno por Crithidia luciliae.

De otros líquidos estudiados solo fué positivo uno en LCR por captación de ADN cuando lo fué negativo en suero y los demás que fueron negativos en suero lo fueron también en el líquido estudiado. (ver tablas 3 y 4)

### Pacientes con LEG y AAN positivos en suero.

De 16 pacientes con AAN positivos en suero (10 con proteinuria y 6 sin proteinuria) por inmunofluorescencia, fueron positivos 5 en orina; de 13 positivos en suero (8 con proteinuria y 5 sin proteinuria) por captación de ADN 9 fueron positivos en orina; de 8 positivos en suero por Crithidia luciliae (6 con proteinuria y 2 sin proteinuria) 3 lo fueron en orina. Loas AAN en otros líquidos corporales positivos en suero -- fueron: en LCR dos por inmunofluorescencia y dos por captación de ADN así como 1 por Crithidia luciliae; en líquido de ascitis se encontró AAN positivos por inmunofluorescencia y captación de ADN así como en suero; finalmente en líquido pericardico presentó AAN negativos al mismo tiempo que en el suero.

De los resultados encontrados, la presencia de AAN en líquidos corporales tiene relación con los títulos encontrados en el suero y con el patron de inmunofluorescencia encontrado. (ver - tablas 5 y 6).

TABLA 3.

AAN SUERO Y ORINA DE PACIENTES CON LEG

PACIENTES LEG CON  
PROTEINURIA  
(N=22)

FLUORESCENCIA    CAPTACION    CRITHIDIA  
DNA

|           |    |    |    |
|-----------|----|----|----|
| SUERO (+) | 10 | 8  | 6  |
| ORINA (+) | 5  | 7  | 3  |
| SUERO (-) | 12 | 14 | 16 |
| ORINA (+) | 1  | 1  | 0  |

PACIENTES LEG SIN  
PROTEINURIA  
(N=10)

|           |   |   |   |
|-----------|---|---|---|
| SUERO (+) | 6 | 5 | 2 |
| ORINA (+) | 0 | 2 | 0 |
| SUERO (-) | 4 | 5 | 8 |
| ORINA (+) | 0 | 2 | 0 |

TABLA 4.

AAN EN LIQUIDOS CORPORALES DE PACIENTES CON LEG.

LIQUIDO ESTUDIADO  
(No. DE PACIENTES)

24

| LCR (7)                 | FLUORESCENCIA | CAPTACION DNA | CRITHIDIA |
|-------------------------|---------------|---------------|-----------|
| SUERO (+)               | 6             | 6             | 5         |
| LCR (+)                 | 2             | 2             | 1         |
| SUERO (-)               | 1             | 1             | 2         |
| LCR (+)                 | 0             | 1             | 0         |
| LIQUIDO DE ASCITIS (1)  |               |               |           |
| SUERO (+)               | 1             | 1             | 0         |
| LIQ ASCITIS(+)          | 1             | 1             | 0         |
| SUERO (+)               | 0             | 0             | 0         |
| LIQ ASCITIS(-)          | 0             | 0             | 0         |
| LIQUIDO PERICARDICO (1) |               |               |           |
| SUERO (+)               | 0             | 0             | 0         |
| LIQ PERIC. (+)          | 0             | 0             | 0         |
| SUERO (-)               | 1             | 1             | 1         |
| LIQ PERIC (+)           | 0             | 0             | 0         |

TABLA 5

RESULTADOS POSITIVOS ENCONTRADOS EN ORINA/SUERO

| PACIENTE NUMERO | ORINA               |                      |           | SUERO                       |                      |           |
|-----------------|---------------------|----------------------|-----------|-----------------------------|----------------------|-----------|
|                 | IFL                 | CAPTACION<br>DNA (%) | CRITHIDIA | IFL                         | CAPTACION<br>DNA (%) | CRITHIDIA |
| 1               | PATRON MOTEADO +    | 0.0                  | N         | PATRON MOTEADO<br>(1:100)   | 0.0                  | N         |
| 2               | PATRON HOMOGENEO +  | 0.0                  | N         | N                           | N                    | N         |
| 3               | PATRON MOTEADO +    | 0.0                  | N         | PATRON HOMOGENEO<br>(1:10)  | 82.9                 | N         |
| 4               | PATRON MOTEADO +    | 0.0                  | N         | PATRON HOMOGENEO<br>(1:50)  | 60.45                | N         |
| 5               | PATRON PERIFERICO + | 0.0                  | N         | PATRON PERIFERICO<br>(1:50) | 32.3                 | +         |
| 6               | N                   | 13.45                | N         | N                           | 13.2                 | N         |

N= negativo

Para entender los patrones de inmunofluorescencia ver anexo 1.

RESULTADOS POSITIVOS ENCONTRADOS EN ORINA/SUERO

| PACIENTE NUMERO | ORINA |                      |           | SUERO                       |                      |           |
|-----------------|-------|----------------------|-----------|-----------------------------|----------------------|-----------|
|                 | IFL   | CAPTACION<br>DNA (%) | CRITHIDIA | IFL                         | CAPTACION<br>DNA (%) | CRITHIDIA |
| 7               | N     | 14.6                 | +         | PATRON MOTEADO<br>(1:50)    | 97.4                 | +         |
| 8               | N     | 2.0                  | N         | N                           | 50.89                | N         |
| 9               | N     | 26.6                 | +         | N                           | 52.9                 | +         |
| 10              | N     | 48.4                 | N         | PATRON PERIFERICO<br>(1:50) | 78.7                 | +         |
| 11              | N     | 1.69                 | N         | PATRONPPERIFERICO<br>(1:10) | 30.2                 | N         |
| 12              | N     | 18.6                 | N         | PATRON HOMOGENEO<br>(1:100) | 18.16                | N         |

RESULTADOS POSITIVOS ENCONTRADOS EN ORINA/SUERO

| PACIENTE NUMERO                            | ORINA |                      |           | SUERO                      |                      |           |
|--|-------|----------------------|-----------|----------------------------|----------------------|-----------|
|  | IFL   | CAPTACION<br>DNA (%) | CRITHIDIA | IFL                        | CAPTACION<br>DNA (%) | CRITHIDIA |
| 13   | N     | 4.5                  | N         | PATRON PERIFERICO<br>(+++) | 57.9                 | +         |
| 14   | N     | 1.6                  | N         | N                          | 48.4                 | N         |
| 15   | N     | 7.7                  | N         | N                          | 6.3                  | N         |
| (10) PACIENTES NO<br>LEG.<br>+ PROTEINURIA | N     | 0.0                  | N         | -                          | -                    | -         |
| (10) INDIVIDUOS --<br>SANOS                | N     | 0.0                  | N         | -                          | -                    | -         |
| VALORES NORMA<br>LES (SUERO)               | -     | -                    | -         | N                          | 35%                  | N         |

TABLA 6. AAN POSITIVOS EN LIQUIDOS CORPORALES

| PACIENTE<br>NUMERO             | SUERO |                         |      | OTROS LIQ. CORPORALES |                         |      |   |
|--------------------------------|-------|-------------------------|------|-----------------------|-------------------------|------|---|
|                                | IFL   | CAPTACION<br>DNA<br>(%) | CL   | IFL                   | CAPTACION<br>DNA<br>(%) | CL   |   |
| <u>LCR</u>                     |       |                         |      |                       |                         |      |   |
| 28                             | 1     | HOM ++                  | 37.7 | +                     | N                       | 11.2 | N |
|                                | 2     | HOM +++                 | 95.2 | +                     | HOM +                   | 19.6 | + |
|                                | 3     | HOM +                   | 25.4 | N                     | N                       | 5.9  | N |
|                                | 4     | HOM +++                 | -    | +                     | N                       | -    | N |
|                                | 5     | HOM +                   | 75.0 | +                     | N                       | 0.0  | N |
|                                | 6     | HOM +                   | 58.2 | N                     | N                       | 0.0  | N |
| <u>LIQ. ASCITIS</u>            |       |                         |      |                       |                         |      |   |
|                                | 1     | MOTEADO<br>(1:200)      | 65.1 | N                     | MOTEADO<br>(1:20)       | 18.9 | N |
| <u>LIQ. PERICAR-<br/>DICO.</u> |       |                         |      |                       |                         |      |   |
|                                | 1     | N                       | 0.0  | N                     | N                       | 0.0  | N |

Los porcentajes de captación de ADN encontrados siempre fueron menores en líquidos corporales que en suero (Ver Tabla 5 y 6). Los líquidos analizados de los controles fueron siempre negativos.

#### Inmunoglobulinas en orina.

Los datos encontrados de inmunoglobulinas en orina tienen relación con los títulos de AAN en el suero de aquellos que los presentaron en orina.

De las inmunoglobulinas estudiadas (G, A, M) existe predominantemente la IgG. Los datos de niveles elevados en orina de Igs tienen relación con los niveles elevados en suero, así como con los niveles bajos en ambos líquidos estudiados. (suero y orina).

La presencia de inmunoglobulinas en otros líquidos corporales correlaciona con la existencia de AAN en los mismos. (Ver Tabla 7).

TABLA 7

| PACIENTE<br>NUMERO | ORINA SIN CONCENTRAR |                | ORINA CONCENTRADA |                | PRUEBAS POSITIVAS   |                     |
|--------------------|----------------------|----------------|-------------------|----------------|---------------------|---------------------|
|                    | Igs(mg/ml)           | Protefna(g/l ) | Igs(mg/ml)        | Protefna(g/l ) | AAN suero           | AAN orina           |
| 1                  | 0.31                 | 1.9            | 2.2               | 23             | IFL                 | IFL                 |
| 2                  | 0.088                | 1.8            | 0.185             | 19             |                     |                     |
| 3                  | 0.2                  | 3.0            | 1.78              | 28             |                     | IFL                 |
| 30 4               | 0.075                | 0.54           | 0.78              | 13             | IFL, CAP.DE<br>DNA  | IFL                 |
| 5                  | 0.54                 | 2.0            | 4.5               | 25.5           | IFL, CAP.DE<br>DNA  | IFL, CAP.DE<br>DNA. |
| 6                  | 0.37                 | 1.4            | 3.2               | 14.0           | IFL, CAP. DE<br>DNA | IFL, CAP.DE<br>DNA. |
| 7                  | 0.92                 | 2.1            | 0.96              | 25.0           | CAP. DNA. C.L.      |                     |
| 8                  | 0.20                 | 3.0            | 2.1               | 27.0           | CAP. DNA            | CAP. DNA            |

IFL = inmunofluorescencia  
 C.L. = Crithidia luciliae

| PACIENTE<br>NUMERO | ORINA SIN CONCENTRAR |                | ORINA CONCENTRADA |                | PRUEBAS POSITIVAS         |                   |
|--------------------|----------------------|----------------|-------------------|----------------|---------------------------|-------------------|
|                    | Igs (mg/ml)          | Proteina (g/l) | Igs (mg/ml)       | Proteina (g/l) | AAN suero                 | AAN orina         |
| 9                  | 0.31                 | 0.8            | 1.02              | 9.0            | CAP. DNA.<br>C.L.         | CAP. DNA          |
| 10                 | 3.7                  | 0.9            | 0.39              | 8.2            | IFL, CAP.<br>DE DNA.      |                   |
| 11                 | 0.10                 | 1.8            | 0.94              | 17             | IFL, CAP.<br>DE DNA, C.L. | CAP. DNA.<br>C.L. |
| 12                 | 0.10                 | 0.4            | 0.069             | 3.1            | IFL                       | CAP. DNA.         |
| 13.                | 0.06                 | 2.15           | 0.358             | 19.2           |                           |                   |
| 14                 | 0.06                 | 1.15           | 9.0               | 0.27           | IFL, CAP.<br>DNA          |                   |
| 15                 | 0.06                 | 1.8            | 0.51              | 16.0           | IFL                       |                   |
| 16                 | 0.09                 | 1.8            | 0.32              | 10.1           | IFL, C.L.                 | IFL               |

| PACIENTE<br>NUMERO | ORINA SIN CONCENTRAR |                 | ORINA CONCENTRADA |                 | PRUEBAS POSITIVAS |           |
|--------------------|----------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------|
|                    | Igs (mg/ml)          | Proteina (g/l ) | Igs (mg/ml)       | Proteina (g/l ) | AAN suero         | AAN orina |
| 17                 | 0.056                | 1.4             | 0.52              | 8.6             |                   |           |
| 18                 | 0.016                | 1.1             | 0.056             | 10.0            |                   |           |
| 19                 | 0.017                | 1.4             | 0.26              | 11.0            |                   |           |
| 20                 | 0.72                 | 1.0             | 0.58              | 9.2             |                   |           |
| 21                 | 0.24                 | 2.6             | 1.6               | 18.0            |                   |           |

### CONCLUSIONES

Entre las explicaciones de la negatividad de AAN en pacientes con LEG, se encuentra la posible pérdida hacia otros líquidos corporales; por tal motivo se efectuaron estudios en orina y suero de 32 pacientes con diagnóstico clínico de LEG, 22 de ellos presentaban nefropatía con proteinuria importante. Las muestras fueron analizadas por radioinmunoanálisis anti-ADN y por inmunofluorescencia; en esta última técnica se utilizaron diferentes sustratos: cortes de hígado y riñón de rata y Crithidia luciliae, con ello se efectúa un análisis de los diferentes anticuerpos que se presentan en LEG, combinando especificidad y sensibilidad de los métodos. Sin embargo, en los resultados reportados por Maddison y cols (20) se tiene la necesidad de usar en la técnica de inmunofluorescencia otro tipo de sustrato (por ejemplo: células infectadas por virus de Epstein-Barr, células KB) o identificar y cuantificar por otros métodos la posible presencia de anticuerpos menos frecuentes (por ejemplo: anticuerpos anti-Ro) en pacientes con lupus que presenten anticuerpos antinucleares negativos en suero. Aquí es necesario señalar que los pacientes con lupus estudiados presentan al menos cuatro de los criterios establecidos por la AAR; los pacientes estudiados en el presente trabajo presentan más de cuatro datos clínicos establecidos para su clasificación como LEG.

En la técnica de inmunofluorescencia indirecta se efectuaron diluciones 1:10, 1:50, 1:100 y 1 a 500, además de utilizar el suero total con el propósito de evitar el fenómeno de prozona que pudiera dar falsos negativos. Como control en la concentración de las muestras de orina se determinaron proteínas totales y niveles de inmunoglobulinas antes y después de concentrar aproximadamente 10 veces (Tabla 7). Por otra parte los anticuerpos encontrados en orina fueron adsorbidos con núcleos de timo de ternera con el fin de demostrar su existen-

cia real y no debido a un artificio en las técnicas empleadas (Tabla 8). En la tabla 8 se puede observar que los niveles de los anticuerpos no son los mismos que inicialmente se tienen, pero debe de tomarse en cuenta que hay parámetros técnicos difíciles de controlar ( dilución de la muestra, pérdida de anticuerpo, etc.).

La presencia de AAN en orina es de mayor frecuencia en los pacientes que tienen AAN positivos en suero, 50% por inmunofluorescencia, 87.5% por captación de ADN y 50% por Crithidia luciliae, mientras que en pacientes que presentaban AAN negativos en suero tienen un menor porcentaje de AAN positivos en orina 8.3% por inmunofluorescencia, 7.6% por captación de ADN y 0% por C. luciliae.

Los niveles de AAN encontrados en orina fueron bajos en el mayor número de las muestras analizadas por las técnicas ya mencionadas, menor de 1:10 por inmunofluorescencia (en tejido y C. luciliae) y menor del 13.8% en promedio por captación de ADN (4 de 18).

Sólo 4 pacientes que no presentaban AAN en suero los presentaban en orina: uno de ellos tenía sólo AAN positivos por inmunofluorescencia presentando un patrón moteado y homogéneo sólo en orina concentrada; los otros pacientes restantes presentaban captación de ADN en orina con un porcentaje menor del 10% en promedio, y a su vez 2 de ellos pertenecían al grupo que presentaba proteinuria (2 de 22).

En el análisis de otros líquidos corporales se puede ver que en líquido cefalorraquídeo (LCR) solamente uno (1 de 7) de los pacientes estudiados con lupus y alteraciones neurológicas, tiene AAN negativos en suero y con 6% de captación de ADN en LCR; de los pacientes que presentaban AAN positivos en suero, 2 de ellos (2 de 7) tenían AAN positivos por inmunofluorescencia y captación de ADN de 15.4% en promedio en LCR.

Solamente se encontraron AAN positivos en líquido de ascitis cuando a su vez lo fueron también en suero, presentando por

TABLA 8

| PACIENTE<br>NUMERO | ORINA SIN ADSORBER           | ORINA ADSORBIDA              |
|--------------------|------------------------------|------------------------------|
|                    | IFL / CL / CAPTACION ADN (%) | IFL / CL / CAPTACION ADN (%) |
| 1                  | M / N / 0.0                  | M / N / 0.0                  |
| 2                  | H / N / 0.0                  | H / N / 0.0                  |
| 3                  | M / N / 0.0                  | ¿H? / N / 0.0                |
| 4                  | Pe / N / 0.0                 | N / N / 0.0                  |
| 5                  | N / N / 13.5                 | N / N / 10.0                 |
| 6                  | N / + / 14.6                 | N / + / 6.7                  |
| 7                  | N / N / 2.0                  | N / N / 0.4                  |
| 8                  | N / + / 26.6                 | N / N / 5.17                 |
| 9                  | N / N / 48.4                 | N / N / 11.4                 |
| 10                 | N / N / 1.69                 | N / N / 1.4                  |
| 11                 | N / N / 18.6                 | N / N / 8.2                  |
| 12                 | N / N / 4.5                  | N / N / 0.0                  |
| 13                 | N / N / 1.6                  | N / N / 3.1                  |
| 14                 | N / N / 7.7                  | N / N / 0.0                  |

M - PATRON MOTEADO H- PATRON HOMOGENEEO Pe- PATRON PERIFERICO Pu- PATRON PUNTEADO  
 N - NEGATIVO

inmunofluorescencia el mismo patrón moteado; mientras que en líquido pericárdico lo fueron negativos al igual que en el suero. (Tabla 8).

Del análisis de los resultados encontrados se puede observar que:

- 1.- La aparición de AAN en líquidos corporales se relaciona con su presencia en el suero.
- 2.- Los niveles de AAN encontrados en los líquidos corporales diferentes del suero en pacientes con LEG y AAN negativo en suero fueron bajos.
- 3.- La determinación de AAN en otros líquidos corporales - puede contribuir al diagnóstico cuando son negativos en suero, sin embargo parece poco probable que la seronegatividad se explique por pérdida hacia otros líquidos corporales.

ANEXO I

## CRITERIOS REVISADOS EN 1982 PARA LA CLASIFICACION DE EL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO.

| CRITERIO                 | DEFINICION  |
|--------------------------|---|
| 1.- Eritema malar        | Eritema fijo, levantado o plano sobre la zona malar, tendientes a separarse en el piegue nasolabial.  |
| 2.- Lupus Discoide       | Placas rojas bien localizadas, asintomáticas usualmente situadas en la cara y a menudo en forma de mariposa. Descamación, obstrucción folicular, atrofia y telangectasia de las partes afectadas. |
| 3.- Fotosensibilidad     | Erupción en piel como resultado de exposición a la luz solar.   |
| 4.- Ulceras orales       | Ulceración oral o nasofaríngea, usualmente indolora.  |
| 5.- Artritis             | Artritis no erosiva que puede ser en 2 o mas articulaciones no deformante con tumefacción o derrame.  |
| 6.- Serositis            | a).- Pleuritis o<br>b).- Pericarditis   |
| 7.- Desorden renal       | a).- Proteinuria persistente -- mayor a 0.5 g por día, o<br>b).- Pérdida celular- puede ser eritrocitos, hallazgo de hemoglobina, cilindros granulosos o tubulares.                               |
| 8.- Desorden neurológico | a).- Aprehensión, en ausencia de drogas o desordenes metabólicos como uremia, cetoacidosis o desbalance electrolítico, o<br>b).- Psicosis, en ausencia de drogas o desordenes metabólicos.        |

## 9.- Desorden hematológico

- a) Anemia hemolítica-con reticulocitosis, o
- b) Leucopenia- por debajo de  $4,000/mm^3$  en más de dos ocasiones, o
- c) Linfopenia-menor a  $1500/mm^3$  en más de dos ocasiones, o
- d) Trombocitopenia-menor  $100\ 000/mm^3$  en ausencia de drogas.

## 10.- Desorden inmunológico

- a) Célula LE positiva, o
- b) Anticuerpos anti-ADN en títulos anormales, o
- c) presencia de anticuerpos anti-sm.
- d) Pruebas serológicas falsas positivas para sífilis.

## 11.- Anticuerpos antinucleares

- a) Presencia anormal de anticuerpos antinucleares en ausencia de drogas - que se encuentran asociadas al síndrome de lupus inducido por drogas.

PATRONES OBSERVADOS EN AAN POR ILF

| Patrón Observado  | Explicación   | Ag Asociado.                                     | Padecimiento             |
|-------------------|---|--|--------------------------|
| Patrón Homogeneo  | Tinción nuclear Uniforme y difusa                   | Desoxirribonucleoproteína                        | LEG                      |
| Patrón Periférico | Tinción en la Periferia nuclear                     | ADN de doble cadena y nucleoproteínas solubles.  | LEG                      |
| Patrón Moteado    | Numerosos puntos teñidos y diseminados en el nucleo | SM y RNP   | LEG, EMTC<br>AR          |
| Patrón Nucleolar  | Tinción Homogenea del nucleolo                      | Precursor ribosomico de las ribonucleoproteínas. | Escleroderma<br>LEG, AR. |

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tan EM, Schur PH, Carr RI et al: Deoxyribonucleic acid -- (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J clin Invest 45:1732, 1966.
- 2.- Harbeck RJ, Bardana EJ, Kohler PF et al: DNA: antiDNA complexes: Their detection in systemic lupus erythematosus - sera. J Clin Invest, 52:789, 1973.
- 3.- R. Bruce Trimble, AS Townes, H. Robinson, S.B. Kaplan, -- RW Chandler, AS Hanissian and AT Masi: Preliminary Criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (SLE), Arth Rheum, 17:184-188, 1974.
- 4.- Barnet EV, North AF, Condemi JJ et al: Antinuclear factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, Ann Intern Med, 63: 100,108,1965.
- 5.- Seligmann M, Contrat A, Hamard M: Studies on antinuclear antibodies. Ann NY Acad Sci (part II) 124: 816-832, 1965.
- 6.- Gonzalez EN, Rothfield NF: Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus, N Engl J Med, 274: 1333-1338, 1966.
- 7.- Reichlin M, Mattioli M: Antigens and antibodies characteristic of systemic lupus erythematosus, Bull Rheum Dis, 24:756-760, 1973-74.
- 8.- Erlou JL, Antinuclear antibodies: diagnostic significance and methods. Arthritis Rheum 10:151-159, 1967.
- 9.- Donadio JV jr., Burgess JH, Holey KE; membranous lupus nephropathy: a clinico pathologic study, Medicina, 56:527 536, 1977.
- 10.- Gladman D, Chalmers A, Urowitz MB; systemic lupus erythematosus with negative LE cells and antinuclear factor, -- J Rheumatol, 5:142-147, 1978.
- 11.- Estes D, Christian GL: The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis, Medicine 50: 85-95, 1971.

- 12.- Fries JF, Sregel RC, Testing the preliminary criteria -- for classification of SLE; *Ann Rheum Dis*, 32:171-177, 1973.
- 13.- Lee P, Urowitz MB, Bookman AA, Kochler BE, Smythe HA, Gordon DA, Ogryzlo MA; Systemic lupus erythematosus a review of 110 cases with reference to nephritis, theneruous system, infections, esepctic necrosis and prognosis: *Q J Med*, 46: 1-32, 1977.
- 14.- De Freitas GG, de Queiraz-Basba P, de Figueireido AP: Systemic erythematosus Lupus (BBrezilien bibliografic review and personal experience), *Rhumatologia*, 8:124-131, 1977.
- 15.- Rothschild MB, Verrier JJ, Chesney C, Pher DD, Thompson - DL, James KK, and Badger H; Relationship of clinical findings in systemic lupus erythematosus to seroactivity; -- *Arth Rheum*, 26:45-51, 1983.
- 16.- Hargraves MM, RIchmond H and Morton R; Presentation of two bone marrow elements: The tart cell and the LE cell: *Mayo clinic Proceedings*, 23: 25-57, 1948.
- 17.- Coons AH and Kaplan MH; Localizacion of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of - antigens by means of fluorescent antibody, *J Exp Med*, 91: 1-13, 1950.
- 18.- Friou GJ; Clinical application of lupus serum-nucleopro-- tein reaction using fluorescent antibody technique, *J clin Invest*, 36: 890, 1957.
- 19.- Alarcon-Segovia D; Abtibodies to nuclear and other intra- celullar antigens in the conective tissue diseases, *Cli-- nics in Rheumatic Diseases*, 9:161-175, 1983.
- 20.- Maddison PJ, Provost TT, Reichin M; Serological findings in patients with "ANA-negative" systemic lupus erythema- tosus, *Medicine*, 60: 87-94, 1981.
- 21.- Wolf L, Sheahan M, McCormick J et al: Clasifcation cri- teria for systemic lupus,erythematosus, Frecuency in nor- mal persons, *JAMA*, 236:1497, 1976.
- 22.- Pollak VE; Antinuclear antibodies in families of patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 271:165, 1964.

- 23.- Leonhardt T; Family studies in systemic lupus erythematosus. *Acta Med Scand*, 176 (suppl) 416, 1964.
- 24.- Zeiman B, Kornblum J, Cornog J, Hidreth AE; The prognosis of lupus nephritis. *Ann Intern Med*, 69: 441-462, 1968.
- 25.- Bartholomew BA: Antinuclear antibody tests as a clinically selected screening procedure. *Am J Clin Pathol* -- 61: 495, 1974.
- 26.- Ritdhie RF: The clinical significance of titered antinuclear anti-antibodies. *Arthritis Rheum*, 10: 544, 1967.
- 27.- Alexander WRM, Bemmer JM, Duthee JR: Incidence of the antinuclear factor in human sera, *Ann Rheum Dis* 19: 338, 1960.
- 28.- Seligman M, Carnat A, Hamard M: Studies on antinuclear antibodies. *Am NY Acad Sci*, 124: 816, 1965.
- 29.- Parker MD, Kerby GP; combined titre and fluorescent --- pattern of IgG antinuclear antibodies using cultured -- cell monolayers in evaluating connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis*, 33-465, 1974.
- 30.- Fessel WJ; ANA negative systemic lupus erythematosus. *Am J Med*, 64: 80-86, 1978.
- 31.- Provost tt, Ahmed AR, Maddison PJ, Reichlin M; Antibodies to cytoplasmic antigens in lupus erythematosus: Serologic marker for systemic disease. *Arthritis Rheum*, 20: 1457-1463, 1977.
- 32.- Blomjous FJEM, Feltkamp-Uroom TM: Hiddon anti-nuclear antibodies in sero-negative systemic lupus erythematosus -- patients and in NZB and (NZB X NZW) F<sub>1</sub> mice. *Eur J Immunol*, 1: 396, 1971.

- 33.- Prystowsky SD, Herndon JH jr., Gilliam JN; Chronic cutaneous lupus erythematosus (DLE). A clinical and laboratory investigation of 80 patients, *Medicine (Balt)* 55: 183, 1976.
- 34.- Wertheimer D, Barland P; Clinical significance of immune deposits in the skin in SLE. *Arthritis Rheum*, 19:1249,-- 1976.
- 35.- Koffer D, Agnello V, Thorburn R, et al; systemic lupus -- erythematosus. Prototype of immune complex nephritis in man. *J. Exp Med* 134 (suppl) 169 1971.
- 36.- Appel GB, Williams GS, Metzger JL, et al. Renal vein -- thrombosis nephritic syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med*, 85: 310 1976.
- 37.- Svec KH, Blair JD, Kaplan MH; Immunopathologic studies of systemic lupus erythematosus (SLE) II, tissue-bound immunoglobulins in systemic lupus and in chronic liver disease with LE cell factor. *J Clin Invest*, 46: 558, 1967.
- 38.- Krishnan C, Kaplan MH; Immunopathologic studies of systemic lupus erythematosus (SLE) II, Antinuclear reaction - of gamma globulin eluted from homogenates and isolated glomeruli of kidney from patients with lupus nephritis, *J Clin Invest*, 46: 569, 1967.
- 39.- Levy L, Ramert EV, MacDonald NS et al: Altered immunoglobulin metabolism in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 19:708-715, 1970.
- 40.- Grangiacomo J, Cleary GT, Cole RB, Hoffsten P, Robson AM; Serum Immunoglobulins in the nephrotic syndrome, *N. Engl J Med*, 293: 8-12, 1975.
- 41.- Stevens MB, Knowles B; Significance of urinary gammaglobulin in lupus nephritis. L electrophoretic analysis. *N. Engl J Med*, 267: 1159-1166, 1962.

- 42.- Hansan LA, Tan EM; Characterization of antibodies in human urine. J Clin Invest 44: 703-715, 1965.
- 43.- Persellin RH, Takeuchi A; Antinuclear antibody negative systemic lupus erythematosus: loss in body fluids, J Rheumatol, 7: 547-550, 1980.
- 44.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AC and Randall RJ, Protein measurement with the Folin-Ciocalteu chemical reagent. J Biol Chem 193:265-275, 1951.
- 45.- Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE, Immunology of DNA III. Crithidia Luciliae, a simple substrate for the detection of anti-ds DNA with immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci 254:505-515, 1975.
- 46.- Wold RT, Young FE, Tan EM, Farr RS, Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with DNA, Science 161:806-808, 1968.
- 47.- Tan EM., Cohen AS, Fries JF, et al., The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, 25:1971-1977, 1982.
- 48.- Meryhew NL, Messner RP, Tan EM; Urinary excretion of antinuclear antibodies, J Rheumatol 10:913-919, 1983.