



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ANTIGENO
NUCLEAR Sm.

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

María del Rosario Covarrubias Herrera



México, D. F.

1983



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.

INDICE

I.	INTRODUCTION	1
II.	GENERALIDADES	4
III.	MATERIAL Y METODOS	16
IV.	RESULTADOS	22
V.	DISCUSION	40
VI.	CONCLUSIONES	44
VII.	APENDICE	45
VIII.	BIBLIOGRAFIA	58

INTRODUCCION

En los primeros años de este siglo, cuando la Inmunología estudiaba los aspectos de la relación huésped parásito con un fin teleológico defensivo, se consideró, vistos los resultados de la respuesta inmune, que no existían respuestas autoinmunes. Este concepto se expresó en una frase: "horror auto-toxicus", acuñada por Paul Ehrlich. En esa misma época Donath y Landsteiner describieron sin embargo, el anticuerpo antieritrocito en la Criohemoglobinuria Paroxística (1,2). Desde entonces se multiplicaron los ejemplos clínicos de respuestas autoinmunes, e incluso se atribuyó a éstos un papel fisiológico.

En un buen número de enfermedades humanas, destacando - aquellas que actualmente conocemos como Enfermedades Reumáticas Generalizadas, grupo que incluye el Lupus Eritematoso Diseminado (LED), la Artritis Reumatoide (AR), la Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo (EMTC), la Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP), la poli-Dermatomiositis (PM-DM) y el Síndrome de Sjögren Primario (SS), se han descrito autoanticuerpos que reaccionan con componentes celulares en el citoplasma y en el núcleo, bien ácidos nucleicos, bien proteínas celulares o combinaciones de ambos.

Los anticuerpos antinucleares (AAN) suelen guardar correlación clínica y son de utilidad en el diagnóstico, seguimiento y tal vez en el pronóstico de esos pacientes; sin embargo, no solo su significado clínico les confiere importancia. En Biología, estos anticuerpos antinucleares, que mantienen la especificidad de la respuesta inmune y reconocen epítopes en macromoléculas complejas, pueden ser herramientas valiosas en el aisla-

miento y caracterización de componentes celulares y pruebas biológicas para estudios finos sobre la estructura y función celular.

La producción de estos anticuerpos antinucleares no es un fenómeno que ocurra al azar, como lo demuestra el hecho de que su presencia no es común a todas las enfermedades autoinmunes y su concentración es variable en cada una de ellas. No obstante en la actualidad, aún no sabemos claramente que es lo que desencadena en un momento dado la producción de estos anticuerpos antinucleares capaces de lesionar los propios tejidos; por tanto, su estudio podrá en su momento desentrañar algunos de los complejos mecanismos que operan en la etiopatogenia de las enfermedades reumáticas generalizadas.

A algunos de estos autoanticuerpos se les designa con el nombre de "marcadores inmunológicos" por encontrarse específicamente en ciertas enfermedades; este es el caso del anticuerpo anti Sm, el cual se considera como un marcador inmunológico en el Lupus Eritematoso Diseminado, pues hasta el momento no se ha descrito su presencia en otras enfermedades autoinmunes.

Sin embargo, cuando se pretende detectar dicho anticuerpo, nos encontramos con la limitante de no contar con un antígeno purificado, por lo que se hace necesario usar sueros de pacientes con anticuerpos anti Sm para determinar su reactividad contra antígenos extraídos del núcleo y en ensayos de inmunodifusión establecer identidad entre estos sueros prototipos y los sueros problemas.

De lo expuesto anteriormente se desprende la importancia de contar con un material antigénico purificado que sustituya el extracto soluble nuclear hasta ahora usado.

El objetivo de este trabajo fué el aislamiento y purificación del antígeno nuclear Sm. Como he mencionado anteriormente, la importancia primordial de esta antígeno consiste en su aplicación práctica en el diagnóstico del LED, pues anticuerpos a dicho antígeno se han detectado específicamente en esta enfermedad.

Estudios previos han mostrado que este antígeno está presente en numerosos tejidos de mamífero y no es especie específico, - su origen nuclear ha sido establecido y se conoce su solubilidad en soluciones salinas amortiguadas (3,4). Una fuente satisfactoria para obtener extracto salino rico en Sm es el timo de conejo desecado (5), este extracto que puede obtenerse en el comercio (Pel Freeze Biological Co.) se usó como material inicial.

Para llevar a cabo la purificación del antígeno nuclear Sm se plantearon dos sistemas:

1) Obtenerlo a partir del complejo inmune, esto es, valiéndonos de la especificidad del anticuerpo, asumiendo que en el complejo inmune tendremos solamente el antígeno y el anticuerpo. Después mediante técnicas químicas separar este complejo e identificar sus componentes.

2) Purificar el extracto de timo de conejo inicial (ETC) - mediante técnicas de cromatografía en columna (intercambio iónico y filtración en gel) y evaluar la pureza del material obtenido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

GENERALIDADES

Autoinmunidad.

La autoinmunidad se puede establecer como una condición en la cual se produce daño estructural o funcional por la reacción de inmunocitos o anticuerpos hacia componentes normales del cuerpo (6). Esta definición postulada por Burnet, no es sin embargo aceptada por todos; hay autores como Grabar que consideran al sistema inmunológico no como un mecanismo de defensa, sino como un sistema fisiológico encargado del manejo de sustancias catabólicas y metabólicas, considerando la aparición de autoanticuerpos como un proceso normal (7). Este mismo autor asume que los constituyentes propios son normalmente degradados por enzimas autolíticas, pero en casos de destrucción masiva de tejidos, estas enzimas pueden ser inhibidas por exceso de sustrato, siendo entonces cuando se producen los autoanticuerpos. Otros autores, entre ellos Boyden, piensan que la autoinmunidad representa un proceso fisiológico normal con una importante función en la eliminación de productos de degradación celular de la circulación (8).

Desde que se observó, a principios de este siglo, la presencia de estos fenómenos autoinmunitarios, se han sugerido varias hipótesis tratando de dilucidar dichos procesos. Entre estas teorías, una de las más conocidas es la teoría de las "clonas prohibidas" de Burnet, la cual enuncia que las clonas capaces de sintetizar autoanticuerpos son destruidas en el estado embrionario y por tanto la aparición de autoanticuerpos sería una consecuencia de mutaciones somáticas (9). Esta teoría que en un principio fué aceptada y que sigue siendo útil en un amplio sentido, ha sufrido en el presente algunas -

modificaciones. Se sabe que aunque las mutaciones somáticas - ocurren y pueden provocar algunas modificaciones parciales en la estructura de inmunoglobulinas u otras proteínas, son un fenómeno al azar y no pueden explicar a) los casos de autoanticuerpos específicos inducidos experimentalmente; b) la frecuente aparición de autoanticuerpos en pacientes que sufren de destrucción de un órgano o tejido; c) y la especificidad de estos autoanticuerpos a dichos tejidos (7).

Además se han encontrado circulando células B normales del hombre con receptores de membrana, que son potencialmente reactivos con componentes propios (como el ADN y la tiroglobulina), por tanto, parece que los linfocitos capaces de reaccionar a los autoantígenos se encuentran normalmente presentes, pero están suprimidos o inactivados (9).

Actualmente se acepta que en la patogénesis de la enfermedad autoinmune desempeñan un papel importante factores genéticos, inmunológicos y virales (10). Hay evidencias que sugieren que los genes asociados con el locus principal de histocompatibilidad en el hombre (ALH) pueden ser también importantes en la regulación inmunitaria y en la patogenia de la autoinmunidad. Por ejemplo, algunas enfermedades autoinmunitarias, como la hepatitis crónica activa y la tiroiditis crónica son más frecuentes en los enfermos con ALH-B8.

Se ha observado que la manipulación de autoantígenos en una forma que estimule la función de las células T auxiliares (uso de adyuvantes, portadores inmunogénicos, antígenos de reacción cruzada, etc.) induce también fenómenos autoinmunitarios.

Hay evidencia de alteración en el balance entre linfocitos T y B en situaciones donde concurren anticuerpos antinucleares y autoagresión (11).

Muchas de las enfermedades por autoinmunidad son más comunes en la mujer que en el hombre. La desigual distribución según el sexo sugiere que el sistema endócrino, a través de las hormonas sexuales, ejerce algún papel en la regulación del sistema inmunitario.

Algunos virus han sido asociados a enfermedades autoinmunes - que cursan con anticuerpos antinucleares, especialmente en ratones NZB o en híbridos NZW XNZB F₁ (12).

Entre los posibles mecanismos de inducción de autoinmunidad se sugieren (9):

- 1) inyección de tejido homólogo con adyuvante completo de Freund.
- 2) infección por virus que contienen antígenos que dan reacción cruzada o alteran los antígenos del huésped, haciéndolos autoinmunogénicos.
- 3) fijación de haptenos extraños (como medicamentos) en los tejidos del huésped.
- 4) estímulo inespecífico de la actividad de las células T auxiliares.
- 5) exposición a antígenos extraños de reacción cruzada.
- 6) pérdida de la actividad de las células T supresoras.

En base a sus características clínicas las enfermedades autoinmunes se han dividido en diferentes síndromes incluyendo Lupus Eritematoso Diseminado, Artritis Reumatoide, Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo, Síndrome de Sjögren y otras (13, 14). Una de las características más conocidas de las enfermedades autoinmunes es la aparición espontánea en la sangre de anticuerpos dirigidos contra los antígenos propios (15), además de ser multiformes en su sintomatología y su curso (1).

Anticuerpos Antinucleares (AAN).

El descubrimiento del fenómeno LE fué de suma importancia en el desarrollo del concepto de autoinmunidad asociado con enfermedades humanas (16,17). Poco después se identificó al factor responsable de este fenómeno como un anticuerpo dirigido contra núcleos celulares, demostrando que el ácido nucleico era inmunogénico (17).

En varias enfermedades reumáticas y en otras que no pertenecen a este grupo, se han demostrado AAN dirigidos contra diferentes macromoléculas nucleares. Estos AAN son específicos -

para muchos constituyentes nucleares diferentes, incluyendo ácido deoxiribonucleico (18), deoxiribonucleoproteína (19), histonas (20), ácido ribonucleico (21), material nucleolar (22) y antígenos de extractos nucleares solubles conocidos como ENA (4,23). Generalmente son del tipo IgG o IgM y ocasionalmente - IgA, capaces de fijar complemento.

Los AAN "per se" no son lesivos a la célula, debido a su inaccesibilidad al núcleo celular, pero pueden conjugarse con los antígenos nucleares de algunas células dañadas, en presencia de complemento y los complejos así formados lesionar el endotelio de pequeñas arteriolas o capilares al depositarse allí.

Se ha observado que la incorporación de AAN al medio de cultivo de células no produce efecto citopático (24).

El desarrollo de AAN es expresión de autoinmunidad, sin embargo, hay que considerar la producción de autoanticuerpos como una consecuencia de enfermedades no inmunológicas en las cuales hay destrucción de tejido (sífilis, infarto al miocardio, hepatitis viral), mostrando que este tipo de hallazgo no puede usarse como una evidencia para una etiología inmunológica.

El potencial para generar respuesta autoinmune existe y es operante en el sistema inmunológico normal (7,8,25). La causa de que aparezcan AAN que persisten y son capaces de lesionar tejidos a través de la formación de complejos inmunes, que discriminan entre los componentes nucleares y reaccionan con macromoléculas específicas, segregando enfermedades distinguibles por ese marcaje inmunológico, es sin embargo desconocida (26).

En muchas enfermedades humanas la presencia de autoanticuerpos en el suero indica la importancia de la autoinmunidad en la génesis de tales procesos. Por tanto, la detección de tales anticuerpos es uno de los elementos claves para el diagnóstico de dichas enfermedades.

Los AAN pueden detectarse mediante diversas técnicas como se muestra en el siguiente cuadro (26):

METODOS PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

METODO	SENSIBILIDAD
Células LE	+
Precipitación:	
- Ouchterlony	1 mcg
- contraimmunoelectroforesis	0.01 mcg
Aglutinación:	
- partículas inertes	+
- hemaglutinación	+++
Fijación de complemento	+++
Inmunofluorescencia	+++
Inmunoenzimas	+++
Radioinmunoensayo	1 pg

Entre estas técnicas, la más ampliamente usada es la Inmuno fluorescencia indirecta por su sensibilidad, reproducibilidad y relativa facilidad. Se aprovecha el hecho de que en general estos autoanticuerpos carecen de especificidad de tejido o especies y reaccionan cruzadamente con núcleos de diferentes fuentes (27).

Los iniciadores de esta técnica fueron Coons y col. (28), quienes observaron que los antisueros conjugados a fluoresceína daban una fluorescencia amarillo verdosa distinguible de la autofluorescencia azul de los tejidos.

A través de la experiencia se ha observado que diferentes sueros de pacientes producen diferentes patrones de teñido nuclear cuando son probados con la técnica cuidadosamente estandarizada en secciones de hígado de rata normal (29). Los diferentes sueros antinucleares producen diferentes patrones porque contienen inmunoglobulinas con afinidad para diferentes constituyentes nucleares, cada uno con una localización citológica particular dentro del núcleo celular. Esta observación -

tiene particular importancia porque se ha encontrado que los diferentes patrones de fluorescencia se pueden asociar con antígenos específicos y éstos a su vez se han relacionado con ciertos padecimientos.

Los patrones de fluorescencia más frecuentes son el homogéneo, periférico, moteado y nucleolar.

Se ha observado que los anticuerpos que reaccionan con proteínas no histónicas dan un patrón de inmunofluorescencia moteado; los anticuerpos que reaccionan con ADN e histonas dan un patrón homogéneo o periférico y los anticuerpos que reaccionan con ARN 4 a 6S muestran un patrón nucleolar.

Estos patrones de teñido nuclear se diferencian por la localización de la inmunofluorescencia en la siguiente forma:

1. homogéneo: núcleos totalmente teñidos con la misma intensidad.
2. periférico: numerosos puntos de fluorescencia en la periferia del núcleo.
3. moteado: los puntos de fluorescencia se observan principalmente en el centro del núcleo.
4. nucleolar: nucleolos uniformemente teñidos.

Se debe considerar que el patrón observado con una determinada dilución puede modificarse al manipular el suero, pues anticuerpos de distinta especificidad pueden ser demostrables a distinta dilución. El manejo del sustrato también es de suma importancia, ya que algunos antígenos nucleares son solubles y se requiere fijación previa, pues de otro modo pueden ser eluidos o redistribuidos, dando así un resultado falso negativo. Como puede observarse, la técnica de inmunofluorescencia indirecta ha venido a constituirse en una herramienta valiosa en la determinación de anticuerpos antinucleares; sin embargo, no debe pasarse por alto que esta prueba presenta ciertas limitaciones, es decir, necesita ser cuidadosamente estandarizada para cada tipo de sustrato, con conjugados fluorescentes de una relación constante fluoresceína-proteína, presenta valor limitado en la cuantificación e identificación de varios anti-

cuerpos antinucleares específicos y puede proporcionar resultados falsos negativos en ciertas enfermedades como Síndrome de Sjögren y Esclerosis Sistémica Progresiva. Una de las principales y más valiosas aplicaciones de esta técnica en el Laboratorio Clínico es la detección de enfermedades reumáticas sistémicas.

Entre los posibles mecanismos que contribuyen a la patogenia de las manifestaciones autoinmunitarias se mencionan (10):

a. daño a las membranas celulares, como consecuencia de la acción de autoanticuerpos y complemento.

b. reacciones inflamatorias provocadas por los complejos autoantígeno-anticuerpo-complemento.

c. citotoxicidad debida a las reacciones de los linfocitos sensibilizados con los autoantígenos de las membranas celulares.

De lo expuesto anteriormente se deriva que básicamente los mecanismos de lesión provocada por autoanticuerpos son: el efecto citotóxico directo del anticuerpo sobre las células y la formación de complejos inmunes capaces de activar complementos.

El Lupus Eritematoso Diseminado ha servido de prototipo para el estudio de las enfermedades producidas por complejos inmunes. El anticuerpo y el antígeno se combinan en la sangre o en los tejidos y forman un complejo inmunitario que pone en marcha varios procesos que pueden destruir las células portadoras del antígeno o dañar los tejidos vecinos.

El análisis de anticuerpos antinucleares es ya una práctica de rutina para el diagnóstico de enfermedades reumáticas generalizadas, proporcionando avances prácticos en el tratamiento de dichas enfermedades. También es de suma importancia la aplicación biológica de estos autoanticuerpos; se pueden seleccionar sueros monoespecíficos que tengan altos títulos de autoanticuerpos a constituyentes nucleares individuales. Estos pueden ser usados como reactivos individuales en la detección y localización ultraestructural de antígenos nucleares.

Antígenos nucleares.

Considerando la capacidad del sistema inmune para responder a los distintos antígenos extraños, resulta sorprendente la falta de respuesta a los antígenos propios. La hipótesis de Burnet, de la selección clonal propone que durante la época embrionaria los linfocitos que entran en contacto y reconocen autoantígenos se destruyen, subsistiendo únicamente los linfocitos capaces de reconocer antígenos extraños. Este autor asume que cualquier antígeno presentado al embrión vertebrado en desarrollo, puede clasificarse erróneamente como propio. Experimentalmente se han logrado producir estudios de tolerancia inmunitaria exponiendo algunos animales a antígenos extraños durante el período fetal. Sin embargo, ciertos antígenos provocan una tolerancia mayor que otros, y la duración de la tolerancia es variable también.

Las excepciones al mecanismo de autotolerancia no solo tienen interés por sí mismas, sino por lo que revelan sobre los mecanismos normales de regulación inmunológica. Por ejemplo, ciertos antígenos no entran en contacto con el sistema circulatorio durante la fase inicial crítica del desarrollo embrionario en la que los linfocitos muestran la máxima susceptibilidad para la inducción de la tolerancia, por consiguiente no se desarrolla ésta, y un contacto posterior con el antígeno ha de provocar respuesta inmune. Se ha propuesto un mecanismo patógeno de este tipo en ciertas enfermedades por autoinmunidad (10).

Sin embargo, contrario a lo expuesto anteriormente, se ha demostrado la presencia de anticuerpos hacia tiroglobulina (proteína de gran tamaño sintetizada y almacenada en la glándula tiroidea) a pesar de sintetizarse en períodos tempranos de la vida fetal y circular en pequeñas cantidades, aunque significativas.

Los fenómenos autoinmunitarios reúnen una amplia variedad de antígenos, entre los que se encuentran los antígenos nucleares que se consideran de importancia particular en ciertas --

enfermedades.

Generalmente los antígenos nucleares pueden ser divididos en tres categorías: los ácidos nucleicos (ADN y ARN), las proteínas histonas y las proteínas no histonas (30).

Estas macromoléculas nucleares se consideran "pobres en antígenos" y es sumamente difícil lograr la producción de anticuerpos a dichas moléculas por inmunización en animales normales de experimentación.

Entre las condiciones necesarias para que una molécula sea antigénica, se menciona que se requiere un período de persistencia en el organismo de varias horas. Considerando lo anterior, se asume que la baja inmunogenicidad del ADN nativo y nucleoproteínas puede depender en cierto grado de su corta vida media "in vivo".

Existen dos principales deoxiribonucleasas en los mamíferos, una (DNasa2) es una enzima lisosomal y la otra (DNasa 1) es primariamente una enzima pancreática. Para esta enzima existen un activador estable al calor y en muchos tejidos un inhibidor lábil al calor. El análisis de sueros de Lupus Eritematoso Diseminado mostró una asociación significativa entre la presencia de anticuerpos antinucleares y niveles elevados del inhibidor. Se ha observado que este inhibidor proviene de las plaquetas, como una consecuencia del daño lítico de las mismas (12). Probablemente esto sea el resultado de una gran destrucción plaquetaria en las reacciones inflamatorias. Los elevados niveles del inhibidor pueden actuar previniendo la rápida destrucción de las nucleoproteínas, confiriéndoles de esta manera inmunogenicidad.

Quizás el compendio de las enfermedades por autoinmunidad en los seres humanos sea el Lupus Eritematoso Diseminado (LED). En esta enfermedad el paciente produce un sinnúmero de anticuerpos frente a diferentes componentes del organismo. Algunos de ellos están dirigidos contra los antígenos nucleares antes mencionados.

Hay una variante del Lupus Eritematoso Diseminado que se caracteriza por ausencia de lesión renal y aparición de una forma edematosa de esclerodermia en manos, miositis, adenopatía y motilidad esofágica (31). En estos pacientes es bajo o nulo el nivel de anticuerpos anti ADN, responden rápidamente a los corticoesteroides y muchos entran en remisión casi completa de la enfermedad. Se ha observado en ellos altos títulos de anticuerpos a los antígenos nucleares Sm y RNP (ribonucleoproteína). El antígeno nuclear Sm está considerado dentro de la categoría de las proteínas no histonas. Los anticuerpos a proteínas ácidas nucleares incluyen al antígeno Sm, RNP (ribonucleoproteína), SSA (antígeno A en el síndrome de Sjögren), SSB (antígeno B en el síndrome de Sjögren) y aquellos antígenos que son reactivos con sueros de pacientes con Artritis Reumatoide y Esclerodermia.

Estos anticuerpos se identifican por métodos de inmunodifusión, en los cuales la identidad inmunológica ha sido demostrada con un suero de referencia estándar.

En la siguiente tabla se muestra la asociación que se ha encontrado entre ciertos autoanticuerpos a antígenos nucleares y determinadas enfermedades (26):

ANTIGENOS NUCLEARES Y ENFERMEDADES ASOCIADAS

Especificidad antigénica	Enfermedad asociada
--------------------------	---------------------

1. Anticuerpos a ADN

- | | |
|---|--|
| a. ADN nativo | Anticuerpo probablemente restringido a LED. |
| b. Determinante antigénico a ADN de una y doble cadena. | Títulos altos de este anticuerpo en LED. Títulos más bajos en otras enfermedades reumáticas. |
| c. ADN de una cadena | Anticuerpo presente en enfermedades reumáticas y no reumáticas. |

Continuación Tabla.

Especificidad antigénica	Enfermedad asociada
2. Anticuerpos a histonas	
a. H2A-H2B	se encuentra frecuentemente en LE inducido por drogas y con menor frecuencia en LED.
b. H1, H3-H4	LED.
3. Anticuerpos a proteínas no histonas	
a. Antígeno "Sm"	Anticuerpo probablemente restringido a LED.
b. Ribonucleoproteína nuclear.	Títulos altos en enfermedad mixta del tejido conjuntivo y más bajos en otras enf. reumáticas.
c. Antígeno "SS-B"	Anticuerpo presente en Síndrome de Sjögren.
4. Anticuerpos a otros antígenos nucleares	
a. LANA (antígeno nuclear - Leucemia mielógena aguda y otras asociado a leucemia)	leucemias.
b. SS-A	Síndrome de Sjögren y LED.
c. RANA (antígeno nuclear- asociado con artritis-reumatoide).	Artritis reumatoide y Síndrome de Sjögren con artritis reumatoide.

De particular importancia en nuestro estudio, el anticuerpo Sm se considera un marcador inmunológico del Lupus Eritematoso Diseminado. No ha sido descrito en otras enfermedades reumáticas generalizadas o en otras condiciones que cursan con anticuerpos antinucleares. Por tanto la detección de dicho anticuerpo en sueros de pacientes es de valor clínico en el diagnóstico de LED.

El principal problema en la identificación de anticuerpos a antígenos nucleares estriba en la dificultad de contar con un antígeno individual purificado. Debido a esto, es de suma importancia el aislamiento y purificación de antígenos nuclea-

res individuales, pues el estudio de dichos antígenos es de gran valor en el reconocimiento de anticuerpos específicamente asociados con ciertas enfermedades.

Se decidió abordar el estudio de este antígeno en particular porque muchos de los pacientes que ingresan al Instituto Nacional de Cardiología presentan sintomatología de enfermedades reumáticas. El empleo de un antígeno purificado ayudaría a establecer un diagnóstico más rápido y preciso de dichas enfermedades.

MATERIAL Y METODOS

1. Material clínico.

a. Preparación de Inmunoglobulina G (IgG) de los sueros.

Los sueros fueron usados como reactivos inmunoquímicos de muy alta especificidad para aislar e identificar al antígeno - Sm. Se usaron sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Diseminado y se seleccionaron aquellos conteniendo anticuerpos al antígeno Sm. Estos sueros mostraban anticuerpos antinucleares positivos en ensayos de Inmunofluorescencia indirecta, con un patrón predominantemente moteado; en pruebas de inmunodifusión - mostraban una línea de precipitación única en identidad con sueros prototipos anti Sm.

Se trabajó con cuatro sueros, tres de ellos pertenecientes al - sexo femenino con edades de 33, 19 y 18 años y el cuarto suero pertenecía a un paciente del sexo masculino de 20 años de edad. Una vez establecido su carácter anti Sm, los sueros se precipitaron al 50 % con sulfato de amonio saturado (SAS) y se eluyeron a través de una columna de DEAE-celulosa para obtener la - fracción IgG (32) con actividad anti Sm.

b. Preparación del antígeno.

El antígeno Sm fué obtenido junto con otros antígenos nucleares a partir de un extracto acetónico de timo de conejo - (Pel³ Freeze Biological Co.) mediante la siguiente técnica:

1.- Se hizo una suspensión que contenía 75 mg de extracto de timo de conejo (ETC) por ml de PBS pH 7.3, azida de sodio - 0.01%, EDTA 0.01 M y PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) - 2×10^{-7} M. El PMSF es un inhibidor de proteasas (33).

2.- Se extrajo durante 4 hs a 4°C con agitación magnética

a baja velocidad y sin producción de espuma para evitar desnaturación.

3.- Se centrifugó a 10,000 g durante 15 min.

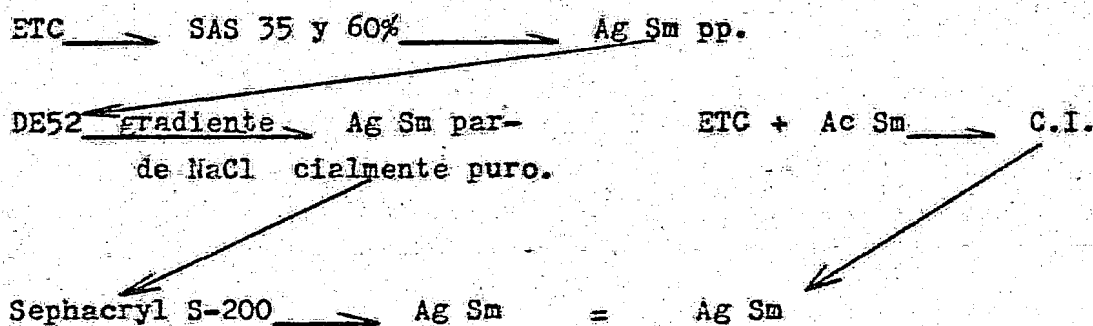
4.- Se separó el sobrenadante, cuyo contenido proteico varía de 10 - 15 mg/ml.

5.- Se separó en pequeñas alícuotas y se almacenó a -20°C .

NOTA: las técnicas y soluciones cuya descripción no aparece en este texto, se localizan al final, en el Apéndice.

II. Procedimiento que se siguió en la purificación del antígeno.

Los pasos generales que se siguieron en la purificación del antígeno Sm se muestran en el siguiente esquema:



donde:

ETC: extracto de timo de conejo

SAS: sulfato de amonio saturado

Ag Sm pp.: antígeno Sm precipitado

DE52: DEAE celulosa

Ac: anticuerpo

C.I.: complejo inmune

a. Precipitación con SAS.

Esta técnica se basa en que el agua de la solución proteica es capturada por las moléculas de sulfato de amonio que se están agregando, hasta que llega un momento en que la cantidad de agua presente no es suficiente para mantener en solución a las moléculas proteicas, sobreviniendo así la precipitación -

El extracto nuclear obtenido (ver preparación del antígeno), se trató con SAS para obtener dos diferentes precipitaciones, 35 y 60%, pues se ha descrito de esta manera una purificación parcial del material antigénico (34). Cada una de las fracciones obtenidas (dos precipitados y un sobrenadante) fué probada mediante la técnica de Ouchterlony, para reconocer en cual de ellas se encontraba la reactividad antigénica.

b. Cromatografía.

1. Intercambio iónico.

El intercambio iónico se puede definir como el intercambio reversible de iones en solución con iones electrostáticamente unidos a un medio de soporte insoluble. Las matrices generalmente usadas en la separación de proteínas son polímeros de dextrana, poliacrilamida y los derivados cargados de la celulosa. El valor de esta técnica en el aislamiento y separación de compuestos cargados, estriba en que pueden encontrarse las condiciones bajo las cuales algunos compuestos se unen electrostáticamente a una matriz, mientras que otros compuestos en estas mismas condiciones no lo hacen. (35).

El extracto nuclear se purificó a través de una columna de DEAE celulosa; debido a las características de carga de la matriz celulósica (carga positiva) y del antígeno Sm (carga negativa), éste queda unido electrostáticamente a la columna; en estos casos, en que el componente que se desea separar se une a la matriz de la columna, es necesario eluirlo, ya sea con un aumento en la concentración de sal o un cambio en el pH; en este caso se usó un gradiente lineal de cloruro de sodio cuya concentración iba de 0 a 0.75 M. Esta concentración se eligió mediante ensayos experimentales previos, observándose que en este rango de concentración era posible recuperar el material antigénico.

Se usó una columna cuyas dimensiones son las siguientes: altura 55 cm, diámetro 2.0 cm y volumen 150 ml; el amortiguador usado fué TRIS- PO_4 0.005 M pH 8.0; la velocidad de flujo —

empleada fué de 0.36 ml/min y el volumen de las fracciones colectadas de 60 gotas (3.5 ml).

Se hicieron dos experimentos de este tipo, variando únicamente uno del otro en la concentración proteica total de la muestra; esto es, se usaron 460 y 200 mg de proteína total en el primero y segundo experimento respectivamente. Se determinó la absorbencia a 260 y 280 nm de cada una de las fracciones colectadas y su actividad antigénica por contrainmuno electroforesis (CIEF) e inhibición de la hemaglutinación (IHA).

2. Filtración en gel.

La separación de antígenos y anticuerpos en base a su tamaño molecular pueden ser dados por cromatografía en columna, usando geles de diferente tamaño de poro. Esencialmente el principio de esta técnica es que las moléculas más grandes que el poro del gel no pueden penetrar las partículas del gel y pasan a través del líquido en las partículas. Estas moléculas son eluidas primero; las moléculas más pequeñas penetran las partículas del gel y son eluidas más tarde (36).

Considerando que al pH con el que se trabajó (pH 8.0) con la columna de intercambio iónico, muchas de las proteínas poseen carga negativa y pueden por tanto seguir como "contaminantes" de la fracción antigénica, se decidió fraccionar el material con actividad antigénica obtenido en la columna de intercambio iónico, a través de una columna de Sephacryl S-200.

La filtración en gel es una técnica usada en la separación de macromoléculas de diferente tamaño molecular; la matriz que se usó presenta un rango de separación de proteínas de 5,000 a 240,000 daltones.

Se usó una columna con las siguientes dimensiones: altura 100 cm, diámetro 2.5 cm y volumen 550 ml; el amortiguador usado fué PBS pH 7.3; la velocidad de flujo empleada fué de 0.3 ml/min y el volumen de cada fracción colectada fué de 80 gotas (4.5 ml). Se hicieron también dos experimentos derivados de los anteriores, introduciendo la misma variable, es decir, la concentración proteica, usándose para el primero 90 mg y para

el segundo 22 mg. Ambos experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Se determinó la absorbencia a 260 y 280 nm de las fracciones colectadas y su actividad antigénica por CIEF e IHA. Se concentraron las fracciones correspondientes y se determinó su contenido proteico.

c. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las técnicas electroforéticas han sido de las principales herramientas usadas en la caracterización y ensayo de pureza de las macromoléculas.

Este método se basa en el hecho de que moléculas tales como el ADN, ARN y proteínas poseen una carga eléctrica, y por tanto son capaces de moverse cuando son colocadas en un campo eléctrico (32,37). La primera publicación sobre la aplicación de esta técnica que atrajo mucho interés fué la de Tiselius. Posteriormente se hizo una modificación de esta técnica, la adición de un detergente aniónico, dodecil sulfato de sodio (SDS), siendo usada por vez primera por Shapiro y col. (38) y Weber y Osborn (39). Entre las variaciones que se conocen de esta técnica, se encuentran las electroforesis en tubo y en placa en gel de poliacrilamida. En este trabajo se usó principalmente la electroforesis en placa por las ventajas que ofrece sobre la electroforesis en tubo, es decir, el hecho de que en una sola placa se puede hacer una comparación más directa de las muestras bajo condiciones idénticas de pH, temperatura, corriente y voltaje. En este tipo de electroforesis la acrilamida se polimeriza entre dos placas de vidrio (40,41).

La electroforesis se usó como un criterio de pureza, para determinar de una manera comparativa el grado de pureza alcanzado.

Se preparó una placa de poliacrilamida al 12.5%, sometiéndose a electroforesis SDS las siguientes muestras: extracto nuclear inicial, las fracciones obtenidas en las columnas de intercambio iónico y filtración en gel, el complejo inmune, IgG purificada y un estándar de pesos moleculares. También se hizo una -

electroforesis en tubo con geles de poliacrilamida al 7.5% sin SDS; estos geles se corrieron por duplicado, y se tñeron, uno con azul de coomassie y otro con azul de toluidina para detectar la presencia de protefna y ácido nucleico respectivamente. Las condiciones de corrimiento se mencionan en el Apéndice, en la sección correspondiente a electroforesis.

d. Purificación del antígeno a partir del complejo inmune.

Considerando la especificidad de la reacción inmune, se propuso aislar el inmunoprecipitado formado al efectuarse la reacción antígeno-anticuerpo, y a partir de éste, caracterizar el antígeno. Para conseguir este propósito se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1.- Se prepararon placas de inmunodifusión, colocándose en el pozo central el extracto nuclear y en los pozos periféricos el suero anti-Sm.

2.- Una vez formado el inmunoprecipitado se lavaron las placas durante 24 hs con citrato de sodio 0.17 M y después con agua destilada.

3.- Se cortaron cuidadosamente las líneas de precipitación.

4.- El gel con inmunoprecipitado se homogenizó con alícuotas de 1.0 ml de PBS. Se centrifugó a 2,000 rpm 4°C 15 min.

5.- Se leyeron las absorbencias a 280 nm de cada uno de los sobrenadantes y se dió por terminada la extracción cuando se obtuvo una lectura inferior a 0.05.

6.- Las fracciones obtenidas se mezclaron y concentraron, determinándose su concentración proteica.

7.- Este material se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS junto con un estándar de pesos moleculares e IgG purificada.

RESULTADOS

1) Precipitación con sulfato de amonio saturado.

Se probó mediante inmunodifusión doble la actividad antigénica de las fracciones obtenidas al efectuarse la precipitación 35 y 60% del extracto nuclear. Se observó una marcada actividad antigénica en el precipitado de 60%, muy ligera actividad en el sobrenadante y ninguna actividad en el precipitado de 35%.

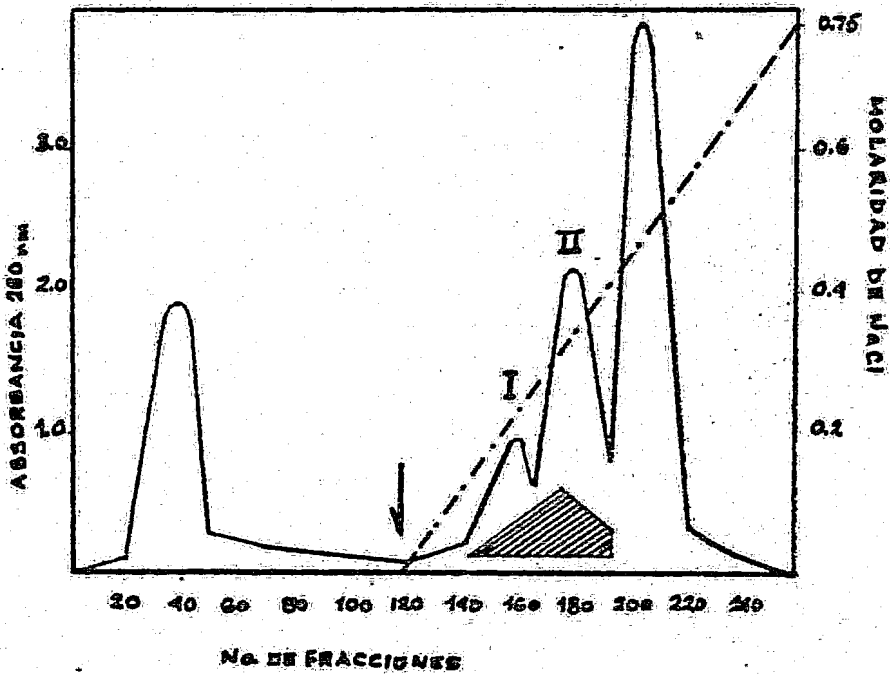
2) Cromatografía de intercambio iónico.

Se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico del extracto nuclear bajo las condiciones ya citada en la sección de Material y Métodos.

Se determinó la absorbencia del eluado a 280 nm obteniéndose los cromatogramas de las figuras I y II. En dichos cromatogramas se observa la presencia de tres picos en la fase correspondiente a la elución. Se mezclaron y concentraron las fracciones correspondientes a cada pico (incluyendo la fase de lavado) y se determinó su reactividad antigénica mediante CIEF e IHA. En la fracción correspondiente al lavado no se detectó actividad antigénica; en el eluado la actividad antigénica fué detectada en el primero y segundo pico, siendo predominante en este último; el tercer pico no presentó actividad antigénica. Las fracciones obtenidas con actividad antigénica se designarán en el transcurso de este trabajo como actividades antigénicas I y II respectivamente.

En los cromatogramas se determinó además la concentración de cloruro de sodio en que se eluía la actividad antigénica, encontrándose ésta en un rango de 0.18 a 0.36 M.

En el primero y segundo experimento se obtuvieron 112 y 35 mg de proteína total con actividad antigénica respectivamente (ver tabla I).



Figs. I y II. Cromatografía en DEAE celulosa de extracto de timo de conejo. En esta purificación preliminar se observan en la fase de elución dos picos con actividad antigénica de Sm (actividades antigénicas I y II respectivamente). La línea discontinua (-.-.-) muestra el gradiente lineal de cloruro de sodio usado. La flecha indica el comienzo del gradiente. La figura debajo de los picos indica reactividad antigénica.

TABLA I

CROMATOGRÁFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO DEL EXTRACTO NUCLEAR INICIAL DE DOS DIFERENTES EXPERIMENTOS. En esta tabla se muestra la cantidad total de proteínas recuperadas con actividad antigénica.

Muestra (extracto nuclear)	Conc. proteica (mg)
Experimento I	112
Experimento II	35

3) Filtración en gel.

Se llevaron a cabo dos experimentos derivados de los anteriores, sometiéndose a purificación la fracción correspondiente a la actividad antigénica II de la cromatografía de intercambio iónico, ya que en ésta se detectó mayor actividad antigénica. Para determinar la uniformidad de empaque y el volumen de exclusión de la columna, se pasó una solución de dextrana azul en una concentración de 2 mg/ml, obteniéndose un volumen vacío de 204 ml.

Se midió la absorbencia a 260 y 280 nm de las fracciones colectadas, obteniéndose los cromatogramas de las figuras III y IV. Se observan tres picos bien definidos, cuyas fracciones correspondientes se separaron y concentraron por liofilización; se determinó su concentración proteica, como se muestra en las tablas II y III. Estas fracciones se designarán como actividades antigénicas B, C y D respectivamente, en el transcurso de este trabajo.

Se encontró reactividad antigénica en las tres fracciones, como se puede observar en la CIEF de la figura V. Al tomar la fotografía de la CIEF se perdió resolución, debido a esto, no se observan claramente las bandas de precipitación.

4) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las fracciones obtenidas en los experimentos de intercambio iónico y filtración en gel, y el precipitado inmune específico obtenido mediante la técnica de Ouchterlony, se sometieron a electroforesis-SDS, usándose un gel de poliacrilamida al 12.5%. Las muestras habían sido previamente disueltas en una solución amortiguadora (ver Apéndice, preparación de las muestras) en las concentraciones anotadas en la tabla IV y éstas fueron sometidas a ebullición durante dos minutos. El SDS, en combinación con calor y un agente reductor (2-mercaptoetanol) causa la desnaturalización de las proteínas en sus cadenas polipeptídicas individuales. Las muestras se aplicaron en los canales del gel de poliacrilamida lo más rápidamente posible, para evitar la -

difusión, principalmente del bromofenol que fué el indicador frontal de la electroforesis. Para más detalles técnicos ver Apéndice en la sección correspondiente a electroforesis.

En las figuras VI, VII y VIII se muestran fotografías donde se aprecia la separación electroforética de cada una de las muestras antes enunciadas.

El peso molecular de una proteína desconocida puede obtenerse, calculando su movilidad relativa y comparándola con las movibilidades de proteínas estándares corridas en el mismo gel.

$$\text{movilidad relativa} = \frac{\text{distancia de emigración proteica}}{\text{distancia de emigración bromofenol}} \quad (\text{cm})$$

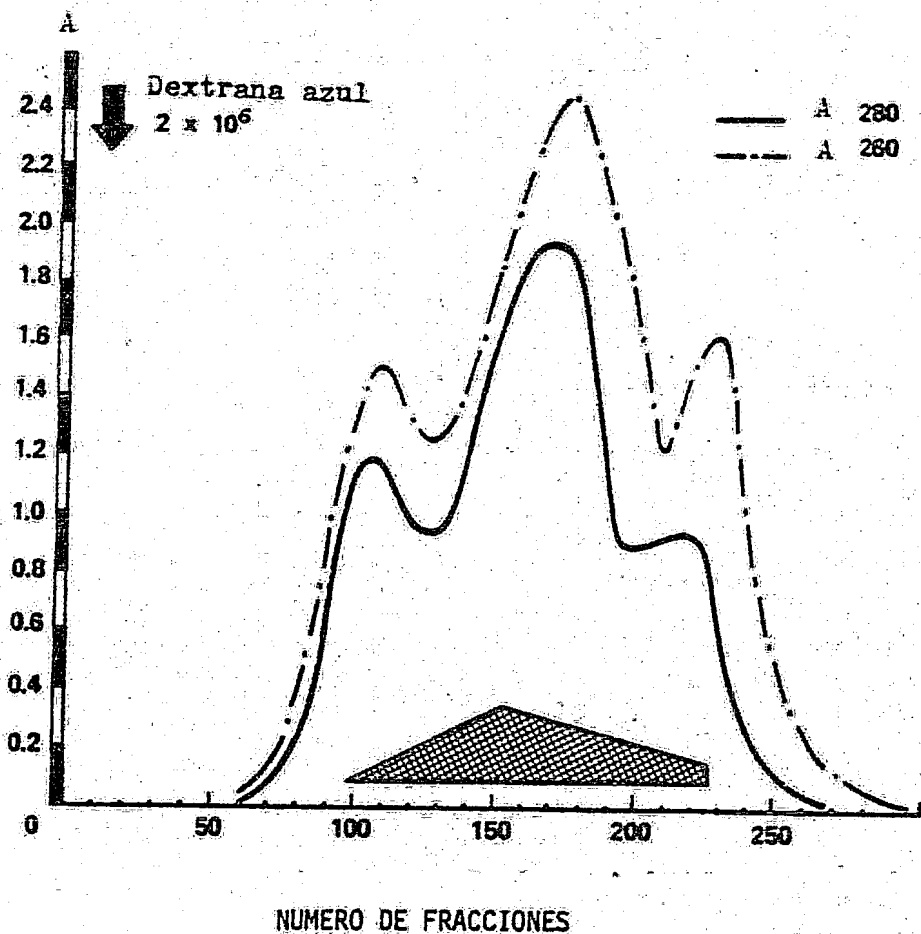
El SDS es un detergente aniónico que se une a las cadenas polipeptídicas en una relación constante de aproximadamente 1.3 - 1.4 g de SDS por g de proteína. Los complejos SDS-polipéptido se encuentran presentes en solución en una forma elipsoidal, y su longitud es proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. Esta relación constante de peso y estructura es la que permite separar a los polipéptidos en la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, de acuerdo con sus pesos moleculares. De esta manera, los pesos moleculares pueden determinarse graficando movilidad relativa VS log. del peso molecular. Cuando el rango de pesos moleculares se encuentra entre 15,000 y - 100,000 daltones, se obtiene una línea casi recta.

En la electroforesis en placa las proteínas están expuestas a idénticas condiciones de pH, temperatura, corriente y voltaje, esto hace posible la comparación de los pesos moleculares (42).

Con estándares de proteínas y sus diferentes movibilidades relativas (ver tabla V) se hizo el trazo del log. en base 10 del peso molecular contra la movilidad relativa, obteniéndose una línea recta de pendiente negativa, figura IX, en la cual se aproximaron los pesos moleculares (no conocidos) de las muestras.

La movilidad relativa experimental determinada se llevó a la recta y se determinó la otra coordenada (log. peso molecular), obteniéndose de esta forma los pesos moleculares. Estos resul-

tados se encuentran tabulados en las tablas VI, VII y VIII. Una observación cuidadosa de estos datos, simultáneamente con las fotografías de electroforesis nos permite visualizar la constancia de una banda de aproximadamente 70,000 daltones. Para la determinación de los pesos moleculares, las bandas contenidas en cada una de las columnas de las placas de electroforesis, se designarán con letras minúsculas, en orden decreciente a su posición en dichas columnas.



- s. III y IV. Cromatografía en Sephacryl S-200 de la actividad antigénica II. En esta purificación se observan tres picos - (actividades antigénicas B, C y D respectivamente), todos ellos con actividad antigénica de Sm. La figura debajo de los picos indica reactividad antigénica. La flecha indica el volumen vacío de la columna.

TABLAS II y III

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL DE LA ACTIVIDAD ANTIGENICA II DE DOS DIFERENTES EXPERIMENTOS. Al purificarse estas muestras mediante esta cromatografía, dieron lugar a tres fracciones (actividades antigénicas B, C y D respectivamente) de las cuales se muestra su respectiva concentración proteica.

Muestra (act. antig. II)	Conc. proteica (mg/ml)
Actividad antigénica B	12.8
Actividad antigénica C	6.0
Actividad antigénica D	1.7

Muestra (act. antig. II)	Conc. proteica (mg/ml)
Actividad antigénica B	0.51
Actividad antigénica C	1.31
Actividad antigénica D	0.98

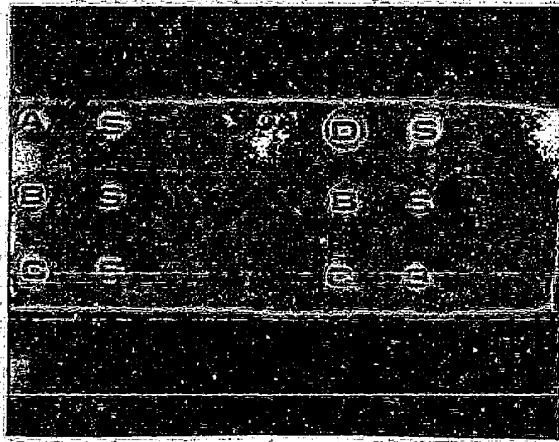


Fig. V. Contraimmunoelectroforesis. Se muestra la reacción entre las actividades antigénicas B, C y D obtenidas por filtración en gel con un suero de referencia (S) con actividad de anticuerpo para el antígeno nuclear Sm. También se muestra la reacción entre extracto de timo de conejo (A) y el mismo suero. Se observa que las fracciones purificadas conservan su actividad antigénica.

TABLA IV

MUESTRAS SOMETIDAS A ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. En esta tabla se muestran las concentraciones proteicas usadas en el experimento.

Muestra	Conc. proteica total (ug)
Actividad antigénica I	50
Actividad antigénica II	55
Inmunoglobulina G	30
Complejo inmune	60
Actividad antigénica B	50
Actividad antigénica C	52
Actividad antigénica D	52

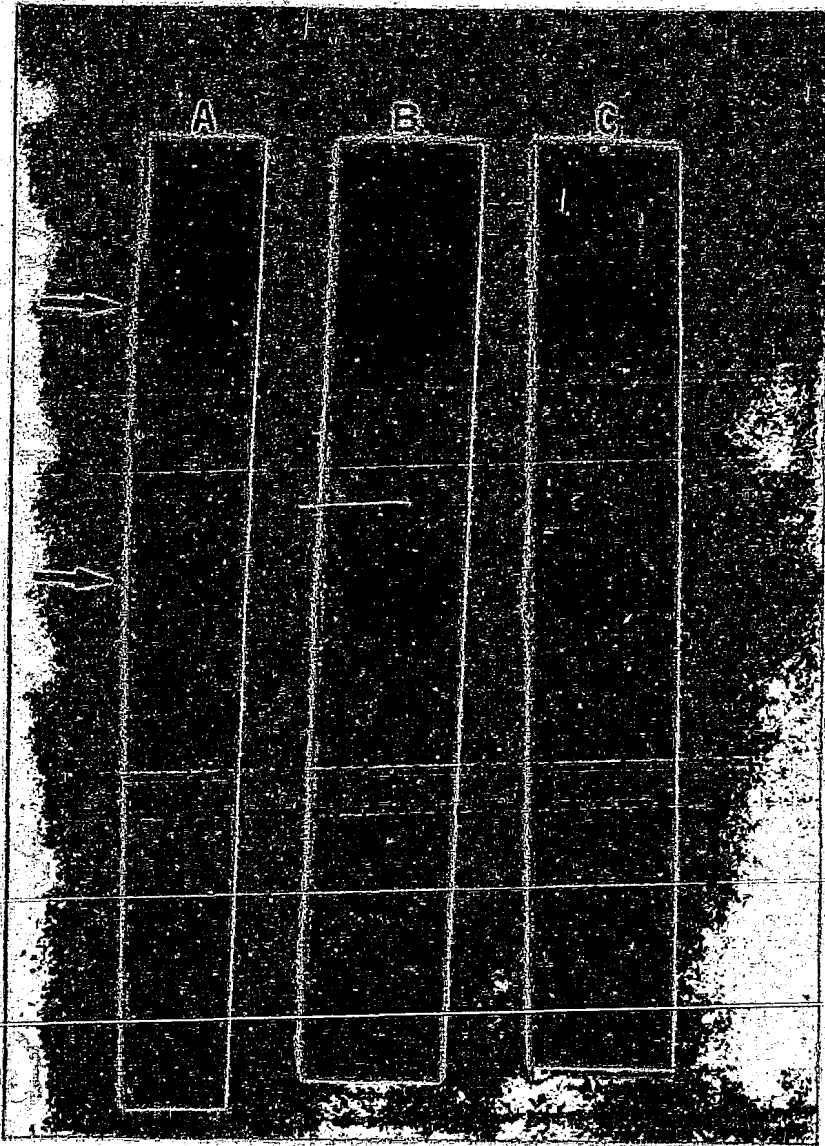


Fig. VI. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Columna A: complejo inmune. Columnas B y C: Inmunoglobulina G purificada. Por comparación entre ambos geles se puede discernir que bandas del complejo inmune corresponden al antígeno nuclear Sm, sabiendo que las bandas de la columna A marcadas con una flecha corresponden a las cadenas pesada y ligera de la IgG.

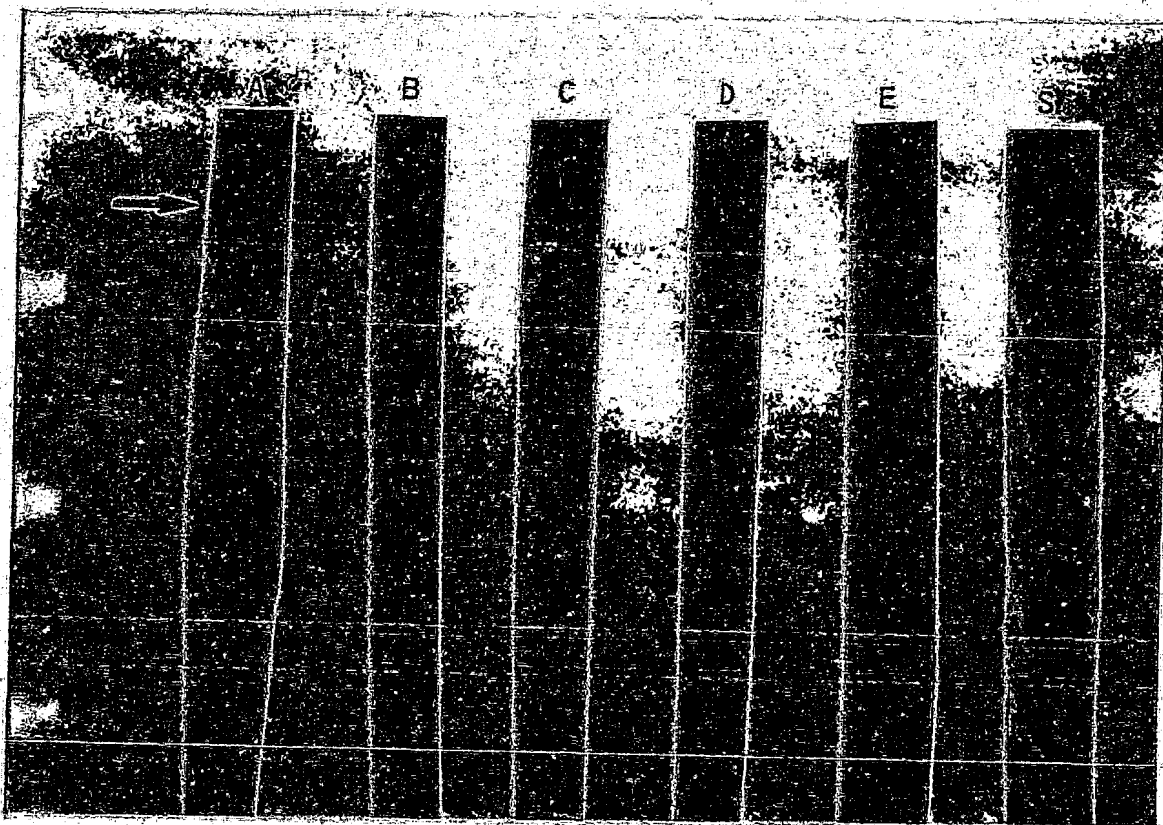


Fig. VII. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Columnas A y B: actividades antigénicas I y II obtenidas por cromatografía de intercambio iónico. Columnas C, D y E: actividades antigénicas B, C y D respectivamente obtenidas por filtración en gel. Columna S: estándar de pesos moleculares. La comparación entre estos geles muestra la persistencia de una banda principal cuya migración electroforética cae en la región de la Albúmina sérica bovina.

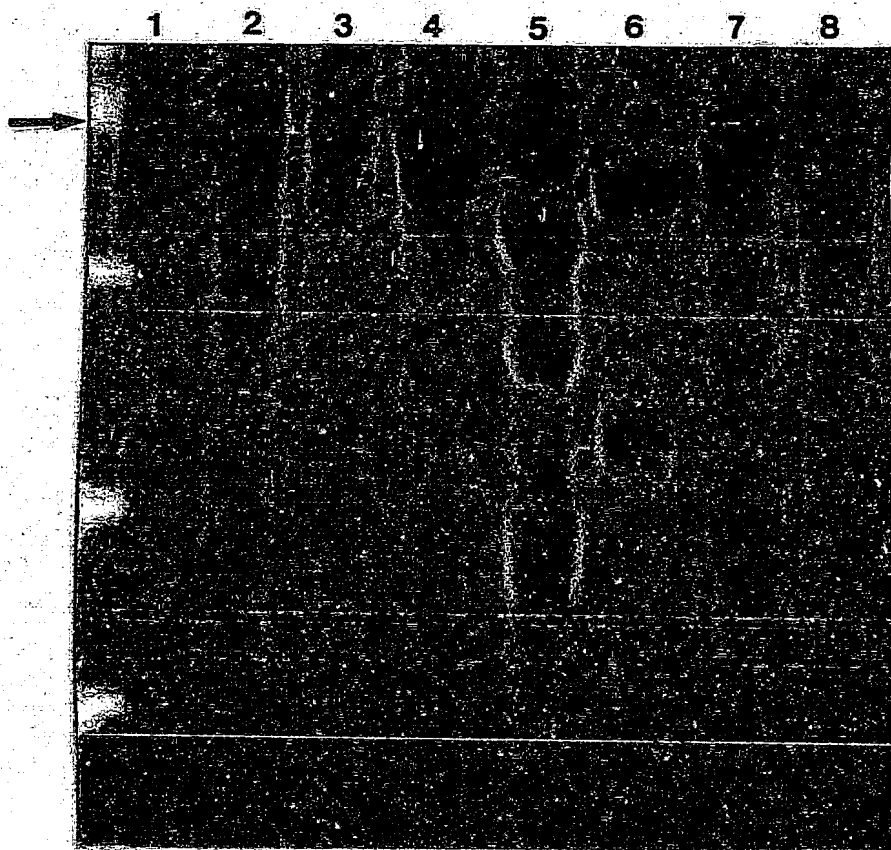


Fig. VIII. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Columnas 1, 2 y 3: actividades antigénicas B, C y D obtenidas por filtración en gel. Columna 4: complejo inmune. Columna 5: estándar de pesos moleculares. Columna 6: Inmunoglobulina G purificada. Columnas 7 y 8: actividades antigénicas II y I obtenidas por cromatografía de intercambio iónico.

La comparación entre estos geles muestra una banda constante en cada uno de ellos con un peso molecular aproximado de 70,000 daltones.

TABLA V

PROTEINAS USADAS COMO ESTANDARES EN ELECTROFORESIS EN GEL DE -
POLIACRILAMIDA-SDS.

Proteína	Peso molecular	$\text{Log}_{10} \text{PM}$	Movilidad relativa
Fosforilasa b	94 000	4.9731	0.046
Albumina bovina	67 000	4.8261	0.122
Ovalbumina	43 000	4.6335	0.238
Anhidrasa Carbónica	30 000	4.4771	0.383
Inhibidor de Tripsina	20 100	4.3032	0.505
Lactalbumina	14 400	4.1584	0.662

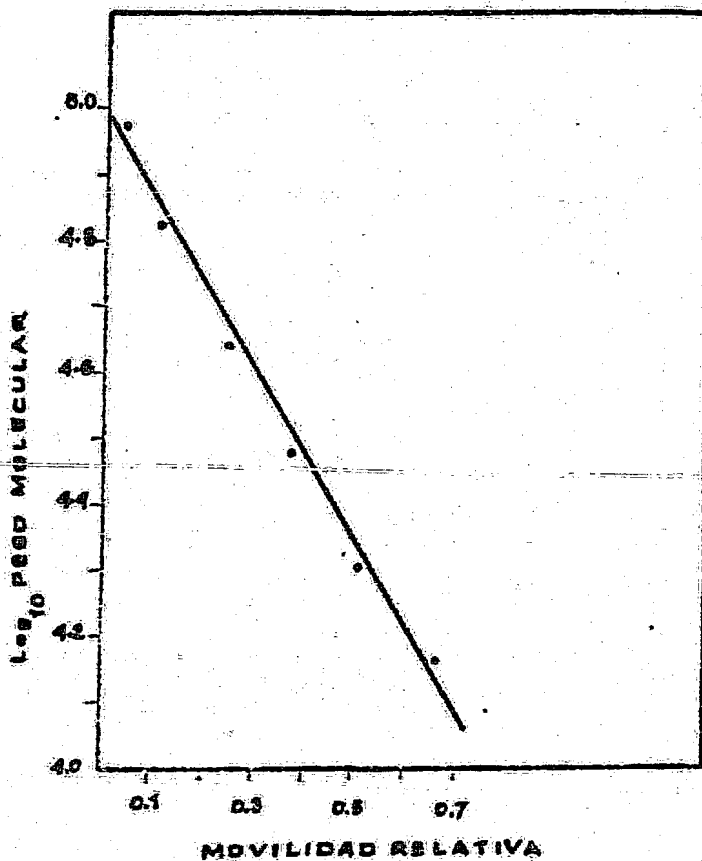


Fig. IX. Trazo usado en el cálculo de pesos moleculares. Gráfica que muestra la movilidad relativa (obtenida por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS) de las proteínas usadas como estándares de pesos moleculares (ver tabla IV) contra el \log_{10} de sus pesos moleculares.

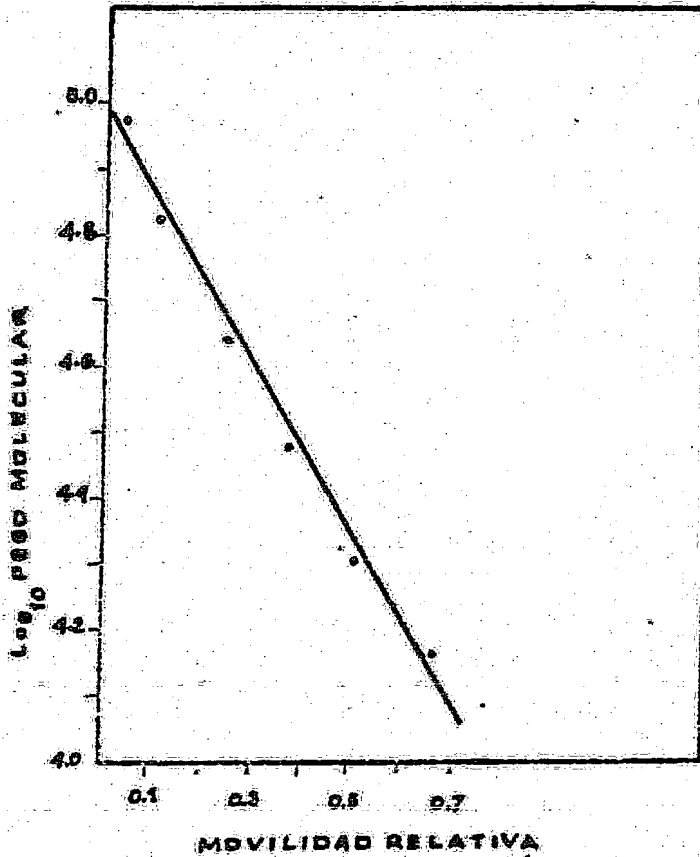


Fig. IX. Trazo usado en el cálculo de pesos moleculares. Gráfica que muestra la movilidad relativa (obtenida por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS) de las proteínas usadas como estándares de pesos moleculares (ver tabla IV) contra el \log_{10} de sus pesos moleculares.

TABLA VI

PESOS MOLECULARES DE CADA UNA DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS DE LAS ACTIVIDADES -- ANTIGENICAS I Y II DERIVADAS DE LA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Muestra	Bandas	Movilidad relativa	$\text{Log}_{10} \text{PM}$	PM
Actividad antigénica I	a	{ 0.052	4.94	87 100
		{ 0.069	4.91	81 280
	b	0.081	4.90	79 430
	c	{ 0.104	4.87	73 280
		{ 0.133	4.83	66 830
	d	{ 0.162	4.79	61 660
		{ 0.180	4.75	56 230
	e	{ 0.220	4.70	50 120
		{ 0.232	4.69	48 980
	f	{ 0.267	4.63	42 170
		{ 0.279	4.61	40 740
	Actividad antigénica II	a	0.058	4.93
b		0.087	4.89	77 620
c		{ 0.098	4.86	72 440
		{ 0.145	4.80	63 100
d		0.191	4.75	56 230
e		0.232	4.69	48 980
f		{ 0.273	4.63	42 170
		{ 0.296	4.60	39 360
g	{ 0.370	4.50	31 260	
	{ 0.389	4.47	29 170	

TABLA VII

PESOS MOLECULARES DE CADA UNA DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR -
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA -SDS DE INMUNOGLOBU-
LINA G PURIFICADA Y COMPLEJO INMUNE.

Muestra	Bandas	Movilidad relativa	$\text{Log}_{10} \text{PM}$	PM
IgG	a	0.151	4.80	63 100
		0.209	4.71	51 290
	b	0.441	4.40	25 120
		0.511	4.31	20 420
Complejo inmune	a	0.047	4.94	87 100
	b	0.076	4.90	79 430
	c	0.087	4.89	77 620
		0.139	4.81	64 570
	d	0.151	4.80	63 100
		0.180	4.75	56 230
	e	0.209	4.71	51 290
		0.226	4.69	48 980
	f	0.453	4.39	24 550
		0.488	4.35	22 130

TABLA VIII

PESOS MOLECULARES DE CADA UNA DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR -
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS DE LAS ACTIVIDA-
DES ANTIGENICAS B, C y D DERIVADAS DE LA CROMATOGRAFIA DE FIL-
TRACION EN GEL.

Muestra	Bandas	Movilidad relativa	$\text{Log}_{10} \text{PM}$	PM
Actividad antigénica B	a	0.087	4.89	77 620
		0.116	4.85	69 980
Actividad antigénica C	a	0.069	4.91	81 280
		0.116	4.85	69 980
	b	0.261	4.65	44 670
	c	0.290	4.60	39 810
	d	0.348	4.52	33 110
Actividad antigénica D	a	0.081	4.90	79 430
		0.110	4.85	69 980

DISCUSION

La presencia de autoanticuerpos al antígeno nuclear Sm - unido a determinados síntomas clínicos se considera de gran valor en el diagnóstico de Lupus Eritematoso Diseminado. Desde hace algunos años se ha venido intentando el aislamiento y caracterización bioquímica del antígeno Sm junto con el antígeno RNP por la estrecha relación que se ha observado entre ellos (4,43,44). Es interesante y de suma importancia el conocimiento de la estructura de estas moléculas, pues quizás de este conocimiento pueda entenderse de que manera están involucradas en la respuesta inmune.

De algunos experimentos preliminares de electroforesis en gel de poliacrilamida, se desprende que el antígeno Sm está constituido tanto por proteína como por ácido nucleico, ya que los geles se tiñeron con azul de coomassie y con azul de toluidina respectivamente. Estos datos coinciden con los de varios autores (45,46) quienes han identificado al ácido nucleico como ARN, aunque queda por definir el papel que desempeñan estas pequeñas ribonucleoproteínas en el núcleo. Se ha sugerido que estén involucradas en el procesamiento de ARN precursor a ARN maduro (45).

En los experimentos de filtración en gel se observaron tres fracciones definidas, todas ellas con actividad antigénica. Cuando estas fracciones se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se observó un patrón electroforético muy semejante en todas ellas, sugiriendo que el material antigénico se encuentra presente en distintos estados de agregación. Estos resultados sugieren además que la unidad básica de estos complejos agregados está constituida por varios monómeros, el más significativo con peso molecular de aprox. 70,000 dal-

tones y probablemente tres más, con pesos moleculares que van de 30,000 a 45,000 daltones aprox.

Por comparación entre los datos obtenidos en las electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, del complejo inmune y de las fracciones provenientes de la cromatografía de filtración en gel, parece ser que la banda proteica de 70,000 daltones es la fracción reactiva, ya que las bandas proteicas de 30,000 a 45,000 daltones que se observan en las muestras de filtración en gel, no aparecen en el gel correspondiente al complejo inmune.

Como se mencionó anteriormente, varios autores se han dedicado a tratar de dilucidar la estructura de este antígeno; entre ellos Lerner y col. (45,46), que reportan haber encontrado siete proteínas en un rango de peso molecular de 12,000 a - 32,000 daltones para los dos antígenos (Sm y RNP), diferenciándose uno de otro en su contenido de ARN, seis polinucleótidos para Sm y solo dos de estos mismos para RNP.

Takano y col. encontraron inicialmente seis proteínas en un rango de peso molecular de 13,000 a 65,000 daltones para ambos antígenos, detectando reactividad antigénica de RNP en dos proteínas de peso molecular de 13,000 daltones y quedando sin identificar las proteínas reactivas de Sm. (47).

Posteriormente estos mismos autores (48) reportan la existencia de cuatro proteínas reactivas de un peso molecular de 13,000 daltones para Sm, mientras que para RNP encuentran cinco proteínas reactivas de 13,000, dos de 30,000 y uno más de 65,000 daltones.

White y col., también interesados en el estudio de estos antígenos nucleares, reportan haber encontrado nueve proteínas con pesos moleculares de 9,000 a 44,000 daltones para el complejo de ambos antígenos. Mencionan además que posiblemente solo en tres de ellas (8,800, 9,800 y 10,800 daltones) esté contenida la reactividad antigénica (49).

Más recientemente estos mismos autores (50) reportan haber encontrado reactividad antigénica para RNP en dos proteínas, una

de 70,000 y otra de 40,000 daltones, en tanto que para Sm es una proteína de 13,000 daltones, cuando el material inicial había sido extracto de timo de conejo; cuando usaron células HeLa ó extracto de hígado de rata, los sueros anti-Sm eran capaces de reconocer una proteína adicional de 29,000 daltones, sin explicarse aún, si esta proteína forma parte del sitio antigénico ó es un antígeno diferente de éste.

De lo expuesto anteriormente se puede ver la diversidad de resultados obtenidos entre diferentes autores y aún entre diferentes publicaciones del mismo autor.

Probablemente estas variaciones puedan explicarse en parte como resultado del uso de diferentes fuentes de tejido, metodologías y condiciones de extracción, aislamiento y purificación, por la presencia de contaminantes, por proteolisis en el transcurso de la purificación sin detectable pérdida de reactividad, también se ha sugerido que puede ser motivo de variación el estado del ciclo celular en que se encuentren las células del tejido que se está usando en el momento de la extracción (51). Es importante observar que en los dos métodos usados en este trabajo en el aislamiento del antígeno Sm (métodos cromatográficos y formación del complejo inmune), a pesar de ser bastante disímiles en su desarrollo arrojan resultados muy semejantes. No obstante, se sugiere que el aislamiento mediante la formación del complejo inmune puede dar resultados más confiables con respecto al método cromatográfico por requerir de menos tiempo en su desarrollo, y por tanto, el riesgo de proteolisis o contaminación de la muestra es menor.

Desde los primeros estudios que se hicieron sobre este antígeno (3) se ha tratado de explicar de que manera afecta al complejo antigénico la presencia de ARN y si éste forma parte del determinante antigénico. Inicialmente RNP y Sm se diferenciaban por la sensibilidad del primero a la acción de RNasa, sin embargo, recientemente se ha encontrado que Sm aunque en menor grado también es sensible a la acción de esta enzima.

Se ha sugerido que el ARN puede contribuir a dar cierta configuración al complejo para que pueda ser reconocido por el anticuerpo o que permita al complejo mantenerse en solución. Recientemente, con el uso de una técnica de transferencia de las bandas polipeptídicas de los geles de acrilamida a filtros de nitrocelulosa (52) se observó que la sensibilidad de RNP a RNasa no es debida a la destrucción de determinantes antigénicos como siempre se había creído, sino a la precipitación de los determinantes antigénicos, los cuales pueden recuperarse de este precipitado y unirse a sus anticuerpos específicos. No sucede lo mismo con Sm, en el cual la mayoría de los polipéptidos permanece en solución después del tratamiento con RNasa, por lo que se piensa, que en parte, la reducción de la reactividad pueda deberse a un cambio en su carga.

Actualmente se está trabajando bastante sobre este tema y es posible que pronto puedan darse respuestas más definitivas acerca de la estructura y función biológica de estos compuestos nucleares.

CONCLUSIONES

- 1.- A partir de un extracto acetónico de timo de conejo, se puede obtener el antígeno nuclear Sm, junto con otros antígenos nucleares.
- 2.- De los resultados obtenidos en los experimentos de intercambio iónico, se deduce que el antígeno Sm es de naturaleza débilmente ácida.
- 3.- Los experimentos de filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS sugieren que este antígeno se encuentra presente en distintos estados de agregación.
- 4.- La persistencia de una banda proteica de aprox. 70,000 - daltones en los experimentos de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, de las diferentes fracciones obtenidas, sugiere que esta proteína es el principal componente antigénicamente reactivo del antígeno Sm.
- 5.- Experimentos preliminares de electroforesis en gel de poliacrilamida confirman la naturaleza nucleoproteica de este antígeno, ya establecida por otros autores (45,46).
- 6.- Se observó una marcada estabilidad del antígeno Sm en el transcurso de la purificación.
- 7.- Considero que la purificación del antígeno Sm, objetivo de este trabajo, fué cumplida, y que puede usarse en el Laboratorio Clínico, sustituyendo al extracto de timo de conejo usado, para el diagnóstico de LED.

APENDICE

I) MÉTODOS GENERALES.

a) Cuantificación de proteínas.

Se siguió el método descrito por Lowry y col. (53) empleando el reactivo de Folín Ciocalteu. Este método está basado en dos reacciones: 1) la formación de un complejo colorido entre los enlaces peptídicos y el ion cúprico en solución alcalina, y 2) la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por el complejo cobre-proteína. Su sensibilidad es de 0.005 - 0.2 mg de proteína.

Reactivos:

Solución A:

Tartrato de sodio 2.0%	0.1 ml
Sulfato de cobre 1.0%	0.1 ml
Carbonato de sodio 2.0% en- NaOH 0.1 N.	10.0 ml

Solución B:

Reactivo de Folín Ciocalteu	1.0 ml
Agua destilada	1.0 ml

Técnica:

1.- Se elabora una curva de calibración haciendo diluciones de una solución que contiene Albúmina sérica bovina 22% - para obtener concentraciones que van de 6.85 - 110 ug de proteína.

2.- Se toma una alícuota de 0.1 ml de la muestra.

3.- Se agrega a todos los tubos 2.0 ml de solución A, se mezclan y se dejan a temperatura ambiente 10 min.

4.- Se agrega a todos los tubos 0.2 ml de solución B, mezclando inmediatamente después de la adición. Se dejan a temperatura ambiente 30 min para el desarrollo de color.

5.- Se determinó la densidad óptica a 750 nm en un espectro

fotómetro Coleman-Junior II-A.

b) Liofilización.

Cuando las proteínas son eluidas de una columna, lo hacen en volúmenes relativamente grandes de solución amortiguadora; debido a esto, se hace necesario concentrar las muestras. Uno de los métodos adecuados para este propósito es la liofilización; este método involucra congelamiento de la solución proteica en las paredes de un matraz y posterior sublimación del agua mediante presión reducida.

Técnica:

- 1.- Se coloca el material a liofilizar en un matraz de vidrio ocupando menos del 50% de su capacidad y se congela en nitrógeno líquido, distribuyéndolo por rotación en la mayor superficie posible del matraz.
- 2.- Cuando la liofilizadora tiene las condiciones de temperatura y vacío adecuadas, se conecta el matraz y se abre la válvula de vacío.
- 3.- Se deja la muestra hasta que está completamente seca.

II) MÉTODOS USADOS EN EL RECONOCIMIENTO DEL ANTIGENO.

a) Inmunodifusión doble.

Este método fué desarrollado simultáneamente por Ouchterlony (1949) (54) y Elek (1948), e involucra el uso de placas de agar en las cuales se hacen horadaciones en la forma adecuada para colocar el antígeno y el anticuerpo. Los dos reactivos difunden en el gel hasta formar un inmunoprecipitado en el punto de equivalencia.

Técnica:

1.- Se prepara agarosa 0.4% en PBS y azida de sodio 0.01%. Se agita y se disuelve completamente por calentamiento en un baño de agua hirviente.

2.- Se pipetea rápidamente 5 ml de la agarosa caliente en pequeñas cajas petri (5.0 cm de diámetro) y sobre mesa nivelada.

3.- Se dejan solidificar a temperatura ambiente.

4.- Se dejan en refrigeración a 4°C por aprox. 30 min.

5.- Se corta el patrón hexagonal con el aparato adecuado. Se aspira el agar de los pozos (diámetro 8 mm, distancia entre ellos 4 mm) por succión con una pipeta pasteur unida al vacío.

6.- Se llenan los pozos con las muestras. Se usan 100 ul en cada pozo.

7.- Se dejan difundir a temperatura ambiente durante 72 hs para el desarrollo de las líneas de precipitación.

8.- Se leen con luz directa y fondo oscuro a las 24, 48 y 72 hs.

9.- Se lavan con citrato de sodio 0.17 M y se leen nuevamente.

b) Contrainmunolectroforesis (CIEF).

La CIEF es una técnica inmunológica de difusión en gel - similar a la técnica de Ouchterlony, a diferencia de ésta, hay aplicación de un campo eléctrico. Los antígenos se mueven hacia el ánodo en el campo eléctrico y los anticuerpos hacia el cátodo debido al fenómeno electroendosmótico (37); cuando los dos se unen se forman una o varias líneas de precipitación, - dependiendo del número de sistemas antígeno-anticuerpo que - existan.

Reactivos:

Amortiguador de barbital pH 8.6:

Barbiturato de sodio	9.0 g
Azida de sodio	1.0 g
Acido Clorhídrico 1.0 N.	6.5 ml
Agua destilada a 1 litro.	

Técnica:

1.- Se disuelve agarosa 0.6% en el amortiguador de barbital por calentamiento en un baño de agua hirviente. Se depositan 3 ml en cada laminilla, se dejan solidificar y se ponen en refrigeración y cámara húmeda de 30-60 min.

2.- se cortan los pozos (diámetro 3 mm, distancia entre ellos 5 mm) con aparato especial y se aspira el agar de los mismos.

3.- se montan las laminillas en la cámara de electroforesis y se llenan los pozos con el antígeno y el anticuerpo, usando azul de bromofenol-albúmina como indicador de la corrida.

4.- Se dejan correr a 5 mA por laminilla hasta que el colorante se desplaza hasta el pozo del anticuerpo. Se leen inmediatamente.

5.- Se dejan en cámara húmeda hasta otro día a temperatura ambiente y se leen de nuevo.

6.- se lavan con citrato de sodio 0.17 M durante 1 h y se leen nuevamente.

c) Inhibición de hemaglutinación.

La inhibición de hemaglutinación es una prueba muy sensible empleada en la detección de concentraciones muy pequeñas de antígenos solubles (9). Se usan glóbulos rojos de carnero tanados, los cuales adquieren la propiedad de adsorber protefina. El principio de este análisis es que el anticuerpo incubado previamente con antígenos solubles, es "inactivado", no reaccionando en una posterior incubación con eritrocitos recubiertos con el antígeno.

Reactivos:

Ácido tánico 0.005% (preparar previo a su uso)

Amortiguador Mc Ilvaine's:

Na_2HPO_4 0.02 M

NaCl 0.15 M

Ajustar a pH 7.8 con ácido cítrico 0.1 M.

Eritrocitos de carnero en sol de Alsever's.

Técnica:

Preparación de sueros:

Suero con anticuerpos a 5m

Suero humano normal

Suero fetal de ternera (Gifco Laboratories)

- 1.- Se inactivan los sueros a 56°C 30 min.
- 2.- Se absorben con igual volumen de eritrocitos de carnero (lavados cuatro veces con PBS).
- 3.- se centrifugan a 2 300 rpm 6 min 4°C.
- 4.- Se repiten los pasos 2 y 3 con los sobrenadantes.
- 5.- Se separan los sobrenadantes y se diluye el suero fetal de ternera 1:100 con PBS.

Preparación de las células:

- 1.- Se centrifugan los eritrocitos de carnero en sol de Alsever's a 2 300 rpm 6 min 4°C.

2.- Se lavan cuatro veces con PBS.

3.- Se resuspenden al 2.5% (vol/vol) en PBS (0.5 ml de paquete celular + 11.7 ml de PBS).

Tanado de las células.

1.- Se mezclan volúmenes iguales de eritrocitos de carnero 2.5% y ácido tánico 0.005% precalentado a 37°C.

2.- Se incuban a 37°C 15 min en baño de agua, agitando a los 5 y 10 min.

3.- se centrifuga a 2 300 rpm 6 min 4°C.

4.- Se lavan dos veces con PBS.

5.- Se resuspenden al 2.5% en PBS y se separan dos ml para las células control.

Acoplamiento del antígeno a los eritrocitos de carnero.

Los eritrocitos se cubren en una concentración de 1 mg de extracto de timo de conejo por cada dos ml de células al 2.5%.

1.- Se prepara el antígeno de manera que se tenga 1 mg de extracto de timo de conejo por dos ml de amortiguador de Mc Ilvaine's.

2.- Se separa la suspensión celular en alícuotas de 2 ml para las células control y el volumen restante para las células a ser cubiertas. Se centrifugan.

3.- se resuspenden en 10 ml de amortiguador Mc Ilvaine's por cada dos ml de células tanadas.

4.- Se agrega el antígeno (1 mg por cada 2 ml de células) a las células prueba.

5.- Se mezclan ligeramente.

6.- Se incuban a 37°C 60 min, agitando cada 10 min.

7.- Se centrifugan y se lavan tres veces con suero fetal de ternera 1:100.

8.- Se resuspenden en 5 ml de suero fetal de ternera 1:100 por cada 2 ml de células prueba y control.

Procedimiento:

Procedimiento:

- 1.- Se marcan en las placas de microtitulación las hileras control y problema.
- 2.- Se agregan 0.025 ml de diluyente (suero fetal de ternera 1:100) a los pozos control y 0.025 ml del material que se desea probar a los pozos problema.
- 3.- Se agrega con el dilutor 0.025 ml de suero de paciente con anticuerpos a Sm y suero humano normal en los pozos correspondientes.
- 4.- Se hacen las diluciones con el dilutor y se incuban - 60 min.
- 5.- Se agregan 0.025 ml de las células control y de prueba en los pozos correspondientes.
- 6.- Se mezclan y se leen a las 2 y a las 12 hs.

Interpretación:

Hemaglutinación: aglutinación granular de las células en el fondo del pozo.

Inhibición de hemaglutinación: botón en el fondo del pozo.

d) Electroforesis.

Técnica:

Electroforesis en placa.

Reactivos (55):

1) Amortiguador inferior pH 8.8:

Tris base	18.17 g
HCl hasta pH 8.8	
SDS	0.40 %
Agua destilada a 100 ml	

2) Amortiguador superior pH 6.8:

Tris base	6.06 g
HCl hasta pH 6.8	
SDS	0.40 %
Agua destilada a 100 ml.	

3) Acrilamida 30%, metilenbisacrilamida 0.8%, en agua destilada.

4) Amortiguador de corrida:

Tris base	6.0 g
Glicina	28.8 g
SDS	0.1 %
Ajustar pH a 8.3	
Agua destilada a 1000 ml.	

Preparación de los geles.

1) Gel inferior:

Amortiguador inferior	5.0 ml
Acr/bis	8.4 ml
Agua	6.6 ml
TEMED	5.0 mcl
Persulfato de amonio 10%	60.0 mcl

2) Gel superior:

Amortiguador superior	2.5 ml
Acr/bis	1.7 ml
Agua	5.8 ml

TEMED	10.0 mcl
Persulfato de amonio 10%	30.0 mcl

Preparación de las muestras.

1.- Las muestras deben contener aprox. 2 microgramos de proteína/microlitro.

2.- Se resuspenden 100 microlitros de muestra en 100 microlitros de la siguiente solución amortiguadora:

0.01 M PO_4 pH 7.0

1.0 % SDS

1.0 % MESH (mercaptoetanol)

3.- Se calienta a ebullición dos min, se recomienda el uso de tubos eppendorf, resistentes al calor. Para evitar pérdidas por evaporación, se puede preparar el doble del volumen indicado.

4.- Se agrega:

Azul de bromofenol	2.0 mcl
Glicerol 50%	4.0 mcl
Muestra	25.0 mcl

Técnica:

1.- Se vierte el gel inferior entre las placas de vidrio selladas y se agregan unas gotas de agua.

2.- Una vez polimerizado el gel, se descarta el agua, se coloca el peine y se agrega el gel superior.

3.- Cuando el segundo gel polimeriza, se quita cuidadosamente el peine y se monta en la cámara de electroforesis.

4.- Se pone el volumen adecuado de cada muestra en los espacios dejados por los dientes del peine y se llenan los depósitos de la cámara con el amortiguador de corrida.

5.- Se deja correr la placa a 15 mA hasta que la muestra penetra el gel inferior; en este momento se aumenta a 30 mA hasta que el colorante llega al extremo inferior de la placa.

6.- Para la tinción y contraste de la placa se siguió la técnica descrita por Fairbanks (56).

III) MÉTODOS USADOS EN LA PURIFICACION DEL ANTIGENO.

a) Precipitación de proteínas con sulfato de amonio saturado.

Reactivos:

Solución de sulfato de amonio saturado:

Se prepara una solución 4.05 M de sulfato de amonio para - obtener el 100% de saturación.

Solución salina borato (SSB):

Acido bórico	6.184 g
Tetraborato de sodio	9.536 g
Cloruro de sodio	4.384 g
Agua destilada a 1 litro.	

Se verifica que el pH quede entre 8.4-8.5; antes de usarse se hace una dilución con 5 volúmenes de solución amortiguadora y 95 volúmenes de solución salina.

Técnica:

1.- Se calcula el volumen necesario de SAS para obtener el grado de saturación deseado (57):

$$V + 100.V_1 = (V + V_1) \% \text{ saturación}$$

donde:

V = volumen de la muestra

V₁ = volumen de SAS

2.- El SAS se agrega gota a gota, con agitación magnética y a 4°C. Al terminar la adición, se deja agitando toda la noche a 4°C.

3.- Se centrifuga a 3,000 rpm 4°C durante 30 min y se separa el sobrenadante del precipitado.

4.- El precipitado se dializa contra SSB hasta prueba negativa de sulfatos con cloruro de bario.

5.- Cuando se requiere una segunda precipitación, se sigue

el mismo procedimiento, determinando el volumen necesario de sulfato de amonio con la siguiente fórmula:

$$V_2 = \frac{V (\text{saturación}_2 - \text{saturación}_1)}{1 - \text{saturación}_2}$$

donde:

V = volumen de la muestra

V_2 = volumen de SAS

b) Cromatografía en columna.

1) Intercambio iónico (DEAE celulosa).

Reactivos:

Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 8.0 (PO_4 0.05M):

Fosfato monobásico de sodio 0.183 g

Fosfato dibásico de sodio 3.36 g

Ajustar pH 8.0

Agua destilada a 500 ml.

Solución amortiguadora TRIS 0.05M pH 8.0 (TRIS 0.05M):

TRIS base 1.33 g

TRIS HCl 2.22 g

Ajustar pH 8.0

Agua destilada a 500 ml.

Solución amortiguadora TRIS- PO_4 0.005M pH 8.0:

PO_4 0.05M pH 8.0 100 ml

TRIS 0.05M pH 8.0 100 ml

Ajustar pH 8.0

Agua destilada a 1000 ml.

DE52: DEAE celulosa (Whatman) que presenta la ventaja de estar prehinchada, es decir, ya se le ha dado el tratamiento con HCl y NaOH, requerido para una mayor exposición de los grupos cargados de la celulosa.

Técnica:

1.- Se prepara un gel con la matriz de celulosa y el amortiguador elegido (en este caso, TRIS- PO_4 0.005M pH 8.0) y se -

procede a la eliminación del material fino.

2.- Se monta la columna verticalmente y se vierte el amortiguador hasta la mitad de ésta.

3.- Se vierte el gel y se mantiene cerrado el tubo de salida hasta que el gel ha sedimentado unos dos cm aprox.

4.- Se abre el tubo de salida, y cuando se llega al volumen deseado de cama, se equilibra con el amortiguador, usando por lo menos dos veces el volumen de la cama.

5.- Se ajusta a cero de absorbencia la unidad registradora, se desecha el amortiguador de la parte superior de la columna y se agrega la muestra previamente equilibrada con el mismo amortiguador.

6.- Una vez que la muestra ha penetrado en la matriz celulósica, se conecta la columna a un recipiente con amortiguador y se colectan las fracciones hasta que su absorbencia es de 0.02 ó menor.

7.- Cuando el componente que se desea separar se une a la matriz de la columna, es necesario eluirlo, ya sea con un aumento en la concentración de sal o un cambio en el pH.

2) Filtración en gel (Sephacryl S-200).

Reactivos:

Solución amortiguadora de fosfatos 0.5M pH 7.3 (PO_4 0.5M):

Fosfato monobásico de sodio	1.38 g
Fosfato dibásico de sodio.	5.68 g
Verificar pH 7.3	
Agua destilada a 100 ml.	

Solución salina fosfato pH 7.3 (PBS pH 7.3)

PO_4 0.5M pH 7.3	20.0 ml
Cloruro de sodio	8.77 g
Verificar pH 7.3	
Agua destilada a 1000 ml.	

Sephacryl S-200: gel constituido de dextranas y bisacrilamida, su presentación comercial es en forma hidratada; Separa pro-

teínas en un rango de peso molecular de 5,000 a 240,000 daltones.

Técnica:

1.- El empaque de la columna es similar al de la columna de intercambio iónico, y se sigue el mismo procedimiento hasta el paso 5.

2.- Se determina el volumen vacío y la uniformidad del empaque pasando una solución de dextrana azul (2 mg/ml) (58).

3.- Se cierra el tubo de salida y se deposita cuidadosamente la muestra, se deja entrar y se conecta la columna a un recipiente con amortiguador.

4.- Se colectan las fracciones hasta que su absorbencia es de 0.02 ó menor.

BIBLIOGRAFIA

1. Burnet, F.M. Immunology, Aging, and Cancer. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 1976.
2. Rose, R.N., Milgrom, E. y Van Oss, C.J. Principles of Immunology. 2a. edición. Macmillan Publishing Co., INC. New York. 1979.
3. Tan, E.M., y Kunkel, H.G. Characterization of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J. Immunol. 96:464, 1966.
4. Mattioli, M. y Reichlin, M. Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with systemic lupus erythematosus sera. J. Immunol. 107:1281, 1971.
5. Tan, E.M. y Peebles, C. Manual of Clinical Immunology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 660. 1976.
6. Burnet, M. Cellular Immunology. Melbourne University - Press-Cambridge U.P. 1969.
7. Grabar, P. Auto-antibodies en immunological theories: an analytical review. Clinical Immunol. and Immunopathol. 4:453, 1975.
8. Boyden, S. Autoimmunity and inflammation. Nature. 201:200, 1964.
9. Fudenberg, H.H., y col. Manual de Inmunología Clínica. - Editorial El Manual Moderno, S.A. 1978.
10. Gordon, B.L. Lo esencial de la Inmunología. 2a. edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. 1975.
11. Delbarre, F., Pompidou, A. y Kahau, A. Study of blood lymphocytes during systemic lupus erythematosus. Pathol. Biol. 19:379, 1971.
12. Koffler, D. Lupus eritematoso sistémico. Investigación y Ciencia. 48:14, 1980.

13. Tan, E.M. y Vaughan, J.H. Immunopathology of the skin. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Penna. 1973.
14. Notman, D.D. Kurata, N. y Tan, E.M. Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Intern Med* 83:464, 1975.
15. Tan, E.M. y Lerner, R.A. An immunological study of the fates of nuclear macromolecules during the cell cycle. *J. Mol Biol* 68:107, 1972.
16. Barnett, E.V. Diagnostics aspects of lupus erythematosus cells and antinuclear factors in disease states. *Mayo Clin Proc.* 44:645, 1969.
17. Beeman, H. The LE cell and phenomenon in lupus erythematosus. *Ann. J. Med. Sci.* 222:473, 1951.
18. Robbins, W., y col. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:575, 1957.
19. Holman, H.R. y Kunkel, H.G. Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science.* 126:162, 1957.
20. Holman, H.H., Deicher, H.R. y Kunkel, H.G. The LE cell and the LE serum factors. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 35:409, 1959.
21. Steinberg, A.D., Baron, S. y Talal, N. The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice. Induction of antinucleic acid antibodies by polyinosinic-polycytidylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63:1102, 1969.
22. Finnas, J.L., Northway, J.D. y Tan, E.M. Antinucleolar antibodies in human sera. *J. Immunol.* 111:996, 1973.
23. Holman, H.R. Partial purification and characterization of an extractible nuclear antigen which reacts with systemic lupus erythematosus sera. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 124:800, - 1965.
24. Rapp, F. Localization of antinuclear factors from lupus erythematosus sera in tissue cultures. *J. Immunol.* 88: - 732, 1962.

25. Bankhurst, A.D. y Williams, R.C. Cellular origins of auto-antibody. A perplexing question. *Ann J Med* 61:303, 1976.
26. Reyes, P.A. y Arroyave, C.M. Anticuerpos antinucleares y el sistema de complemento en enfermedades reumáticas generalizadas. *Biometrica II*. 1:1, 1977.
27. Nakamura, R.M. y Tan, E.M. Recent progress in the study of autoantibodies to nuclear antigens. *Human Pathol.* 9:85, 1978.
28. Coons, A.H., Creeck, H.J., Jones, R.N. y Berkner, E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 45:159, 1942.
29. Beck, J.S. Variations in the morphological patterns of "autoimmune" nuclear fluorescence. *Lancet*. 1:1203, 1961.
30. Rose, R.K. y Friedman, H. *Manual of Clinical Immunol.* - 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.
31. Marni, A.A., y col. *Inmunología e Inmunocquímica*. 2a. edición. Ed. Médica Panamericana. 1980.
32. Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. *Methods in Immunol.* 3a. edición. W.A. Benjamin, Reading, M.A. 1977.
33. Cooper, T.G. *The Tools of Biochemistry*. John Wiley and sons. New York/London/Sydney/Toronto. 1977.
34. Reyes, P.A. y Tan, E.M. DRA-binding property of Sm nuclear antigen. *J. Exp. Med.* 145:749, 1977.
35. Peterson, A. *Técnicas de Laboratorio en Biología Molecular y Bioquímica*. Intercambiadores celulósicos de iones. Ed. - El Manual Moderno. 1975.
36. Pharmacia Fine Chemicals. *Sephadex. Gel filtration in - Theory and Practice*. Jan. 1977.
37. Rose, R.K. *Methods in Immunodiagnosis*. 2a. edición. A Wiley Medical Publication. John Wiley and sons. N.Y./Chichester/Brisbane/Toronto. 1980.
38. Shapiro, A.L., Viñuelas, E. y Mazioli, J.V. Molecular weights estimation of polypeptides chains by electrophoresis in - SDS-polyacrilamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* - 28:815, 1967.

39. Weber, K. y Osborn, M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrilamide gel-electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406, 1969.
40. Studier, W.F. Analysis of bacteriophage T₇. Early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol Biol.* 79:237, 1973.
41. Ames, G.F.L. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. *J. Biol. Chem.* 249:634, 1974.
42. Takács, B. *Methods Immunological.* Academic Press. 1979.
43. Northway, J.O. y Tan, E.M. Differentiation of antinuclear - antibodies giving speckled patterns in immunofluorescence. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1:140, 1972.
44. Mattioli, M. y Reichlin, M. Physical association of two nuclear antigens and mutual occurrence of their antibodies: - The relationship of the Sm and RNA-protein (Mo) systems in systemic lupus erythematosus sera. *J. Immunol.* 110:1313, 1973
45. Lerner, M., y col. Are snRNP's involved in splicing? *Nature.* 283:220, 1980.
46. Lerner, M. y Steitz, J.A. Antibodies to small RNA's complexes with proteins are produced by patients with systemic - lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:5495, 1979.
47. Takano, M., Agris, P. y Sharp, G. Purification and biochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein antigen using purified antibody from serum of a patient with mixed connective tissue disease. *J. Clin. Invest.* 65:1449, 1980.
48. Takano, M., y col. Molecular relationships between two nuclear antigens, ribonucleoprotein and Sm: purification of active antigens and their biochemical characterization. *Biochemistry.* 20:5929, 1981.
49. White, P.J., Gardner, W. y Hoch, S.O. Identification of the immunogenically active components of the Sm and RNP antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:626, 1981.
50. White, P.J. y Hoch, S.O. Definition of antigenic polypeptides in the Sm and RNP ribonucleoprotein complexes.

- ~~Bioch. Biophys. Res. Comm. 102:365,1981.~~
51. Deng, J.S., Takasaki, Y. y Tan, E.M. Nonhistone nuclear antigens reactive with autoantibodies. Immunofluorescent - studies of distribution in synchronized cells. J. Cell Biol. 91:654,1981.
 52. Towbin, H., Stackelin, T. y Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. - Sci. 76:4350,1979.
 53. Lowry, H.O., Rosebrought, J.N., Farr, L.A. y Randall, J.R. Protein measurment with the Folin-phenol reagent. J. Biol Chem. 193:265,1951.
 54. Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26:507,1949.
 55. Laemmli, V.K. Cleavage of structural proteins during the - assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature. 227. - 680, 1970.
 56. Fairbanks, G. y col. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the humen erythrocyte membrane. Biochem. 10:2606,1971.
 57. Weir, D.M. Handbook of Experimental Immunology. Volumen I. Blackwell Scientific publications. 1978.
 58. Pharmacia Fine Chemicals. Blue Dextran 2,000. Jan. 1972.

Abreviaturas Empleadas.

ETC.	Extracto de timo de conejo.
CI.	Complejo inmune.
AG.	Antígeno.
Ac.	Anticuerpo.
Ig.	Inmunoglobulina.
IgG.	Inmunoglobulina G.
AAN.	Anticuerpos antinucleares.
DEAE.	Dietilaminoetilo.
SDS.	Dodecil sulfato de sodio.
SSB.	Solución salina borato.
PBS.	Solución salina fosfato.
SAS.	Sulfato de amonio saturado.
CIEF.	Contrainmunolectroforesis.
LED.	Lupus eritematoso diseminado.
RNP.	Ribonucleoproteína
SSA.	Antígeno A en el síndrome de Sjögren
SSB.	Antígeno B en el síndrome de Sjögren
RANA.	Antígeno nuclear asociado con artritis reumatoide.
LANA.	Antígeno nuclear asociado a leucemia.
IHA.	Inhibición de hemaglutinación.