

13
2ij

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"



DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA FILAMENTOS
INTERMEDIOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN DOMINGUEZ ROBLES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN.	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES DIRECTOS.	16
JUSTIFICACION DEL TRABAJO.	18
OBJETIVOS.	20
MATERIALES	21
METODOS.	27
RESULTADOS	40
DISCUSION.	61
CONCLUSIONES	68
APENDICE I (lupus eritematoso sistémico)	70
APENDICE II (Historias clínicas)	78
BIBLIOGRAFIA	83

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1	Autoinmunidad.	4
Figura No. 2	Espectro de enfermedades autoinmunes . . .	6
Figura No. 3	Tipos de estructuras fibrilares.	11
Figura No. 4	Formación de complejos supramoleculares de actina F.	13
Figura No. 5	Técnica de subcultivo.	28
Figura No. 6	Obtención de laminillas con rearrreglo del citoesqueleto para IFI	31
Figura Ia	IFI de las células HEp-2, teñidas con el suero del paciente No. 1	46
Figura Ib	IFI de las células HEp-2 tratadas con colchicina, teñidas con el suero del paciente No. 1	46
Figura Ic y Id	IFI de las células HEp-2, teñidas con el anticuerpo monoclonal que reconoce los 5 tipos de Filamentos Intermedios.	48
Figura II.	Inmunolectrotransferencia unidimensio- nal de citoesqueletos-tritón de células HEp-2.	52

Figura III	Migración electroforética de citoqueratinas.	55
Figura IV	Inmunolectrotransferencia bidimensional teñido con azul de Coomassie	57
Figura V	Inmunolectrotransferencia bidimensional teñido con el anticuerpo monoclonal que reconoce los 5 tipos de filamentos intermedios	57
Figura VI	Inmunolectrotransferencia bidimensional teñido con el suero del paciente No. 1 .	60
Figura VII	Inmunolectrotransferencia bidimensional teñido con el suero del paciente No. 6 .	60

ABREVIATURAS

AAN	Anticuerpos Antinucleares
AR	Artritis Reumatoide
ARJ	Artritis Reumatoide Juvenil
AHA	Anemia Hemolítica Autoinmune
CREST	Calcinosis, Raynaud, Hipomotilidad esofágica, Esclerodactilia, Telangiectasia
DM	Dermatomiositis
ELISA	Inmunoensayo enzimático
EMTC	Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo
ESP	Escleroderma Sistémico Progresiva
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TORCH	Toxoplasma, Rubeola, Citomegalovirus, Herpes
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
EDTA	Versenato de sodio

DAB

3,3'-diaminobenzidina

RESUMEN

El fenómeno de autoinmunidad es una respuesta inmune celular y humoral, dirigida contra los componentes propios del organismo.

Algunas de las causas que pueden desencadenar la producción de autoanticuerpos, pueden ser las siguientes: el uso prolongado de drogas, la exposición a rayos X, procesos bacterianos, procesos virales persistentes y factores hereditarios.

El LES es una enfermedad autoinmune que no es específica de órgano y puede afectar a la mayoría de los tejidos del individuo.

En este estudio de IFI con 600 sueros de pacientes que presentaron LES, se encontró que 1 de 4 pacientes presentaron anticuerpos contra el citoesqueleto y más específicamente contra los filamentos intermedios.

Por medio de la técnica de ELISA 133 de 150 sueros de pacientes con LES fueron positivos y 200 de 229 sueros de pacientes con AR resultaron positivos, contra citoesqueletos-tritón de células HEp-2.

Con anti-IgM humana y anti-IgG humana monovalentes y por IFI encontramos que el 98% de los sueros fueron IgM y el 2% IgG.

El análisis por inmunotransferencia de la electroforesis unidimensional de proteínas de citoesqueleto-tritón de células HEp-2, nos reveló que los sueros reconocen bandas de polipéptidos de un rango de peso molecular 40-68 Kd.

En un análisis de inmunotransferencia de geles en dos dimen-

siones, 5 pacientes con LES reconocieron tanto citoqueratinas como vimentina. Un paciente de LES con manifestaciones cutáneas solo reconoció citoqueratinas.

INTRODUCCION

AUTOINMUNIDAD

El fenómeno de autoinmunidad es una respuesta inmune celular y/o humoral, dirigida contra los componentes propios del organismo.

La autoinmunidad esta marcada por una actividad excesiva o anormal por parte de las células efectoras inmunitarias. Esta actividad puede incluir la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B y la infiltración de los tejidos o su destrucción por los linfocitos T y macrófagos (1).

Algunas de las causas que pueden desencadenar la producción de autoanticuerpos, pueden ser el uso prolongado de algunas drogas como la hidrolazina, procainamida, α -metildopa, sedormide, estibofen, entre otras (2). Otras causas pueden ser la exposición a rayos X o emisiones de tipo γ , procesos inflamatorios, procesos infecciosos virales persistentes (Pox-virus, Herpes, Epstein-Barr), infecciones bacterianas (Mycoplasma) y factores heredofamiliares, como se muestra en la Figura No. 1.

Las enfermedades autoinmunes presentan en algunos casos anticuerpos dirigidos específicamente contra un órgano. Tal es el caso de la Tiroiditis de Hashimoto o puede ser inespecífica de órgano y afectar a la mayoría de los tejidos del individuo como es el caso del Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Si se hace un espectro de las enfermedades autoinmunes en relación a su especificidad de

AUTOINMUNIDAD*

ANTIGENO	RESPUESTA ALTERADA				RESPUESTA NORMAL		
	+ MHC alterado	drogas e infección	reacción cruzada	antígeno secuestrado	activación no específica	mutación de las células B	
EJEMPLO	virus pox herpes Epstein Barr	sedormide penicilina estibofen	α -metildopa procainamida hidralazina virus mycoplasma	streptococo A E. coli sífilis hetero- antígenos	daño en el esperma cristalino	adyuvantos bacteria	?
RECONOCIMIENTO							
CELULAS T							
CELULAS B							
RESPUESTA	citotoxicidad	anticuerpo	anticuerpo	anticuerpo	citotox. ? anticuerpo	citotox. ? anticuerpo	anticuerpo (monoclonal)
ESPECIFICIDAD	respuesta alterada	no-respuesta	respuesta	respuesta	respuesta	respuesta	respuesta
EFEECTO	1.- Eliminación del virus 2.- tejido dañado	1.- Destrucción de células (plaquetas, células rojas, tiroideas, estómago, adrenal) 2.- Función con interferencia (neuro-muscular, esperma, tiroidas) 3.- Enfermedad de complejos inmunes (L.E.S., A.R.)					
	1	2	3	4	5	6	7

† MHC = ANTIGENOS PRINCIPALES DE HISTOCOMPATIBILIDAD

* (J.H.L. PLAYFAIR; Immunology at a glance; ed. blackwell scier.ific; pp30; 1979)

órgano estas enfermedades quedarían en los extremos como se muestra en la Figura No. 2.

Ciertas enfermedades autoinmunes como LES, Artritis Reumatoide (AR), Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP), Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo (EMTC), etc., se caracterizan por la presencia en suero de anticuerpos dirigidos contra componentes nucleares o citoplasmáticos. La especificidad de estos anticuerpos y la frecuencia con que se observan en diferentes enfermedades ha permitido definir más claramente los diagnósticos. De lo anterior se desprende que los anticuerpos antinucleares (AAN) son parámetros serológicos útiles en el diagnóstico de estas enfermedades (4, 5).

Aunque originalmente se pensó que los AAN eran específicos para LES también se observan AAN en pacientes con otras enfermedades como AR, ESP, EMTC, Síndrome de Crest y Raynaud. Su valor diagnóstico mejora cuando se titulan dichos anticuerpos y se determina su especificidad antigénica. Para esto resultan útiles las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Inmunodifusión, ELISA y Radioinmunoanálisis. Todos estos estudios además de la historia clínica son finalmente las herramientas para un diagnóstico acertado.

Una técnica ampliamente utilizada que ha sido de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes es la IFI para la determinación de AAN. Esta técnica se basa en la interacción específica de anticuerpos del paciente con el antígeno en las células utilizadas como sustrato. Así como la interacción específica de los anticuerpos con anti-anticuerpos los cuales tienen unido un fluoróforo que es el que realmente detectamos. Por esta razón se le

Organo específica



No específica de
órgano

Tiroiditis de Hashimoto
Mixedema primario
Tirototoxicosis
Anemia perniciosa
Gastritis atópica autoinmune
Enfermedad de Addison
Diabetes juvenil
Miastenia gravis
Esclerosis múltiple
Anemia hemolítica autoinmune
Púrpura trombocitopenica idiopática
Leucopenia idiopática
Síndrome de Sjögren
Síndrome de Crest
Raynaud
Artritis reumatoide (AR)
Dermatomiositis
Escleroderma
Lupus discoide
Lupus eritematoso sistémico (LES)

Fig. No. 2 Espectro de Enfermedades Autoinmunes(3)

denomina Inmunofluorescencia Indirecta.

Existen varios tipos de sustratos que son utilizados en la determinación de AAN por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) como: cortes de hígado, riñón de rata, epidermis bovina, líneas celulares en cultivo como BHK-21, Vero, HeLa y HEP-2.

En un estudio realizado en el Centro Médico "La Raza", las células epiteliales de carcinoma de laringe humano (HEP-2) resultaron ser las más adecuadas para el estudio de AAN.

Se han descrito diferentes patrones de Inmunofluorescencia Indirecta para los AAN que se relacionan con diferentes enfermedades (4).

El patrón homogéneo tiñe de una manera uniforme el núcleo, es observado generalmente con anticuerpos para desoxirribonucleoproteínas, histonas, o complejos de DNA-histonas, y en LES.

El patrón periférico tiñe la periferia del núcleo y es producido por los anticuerpos que reaccionan con DNA nativo y complejos de DNA-histonas, se observa frecuentemente en LES activo.

El patrón nucleolar es causado por la tinción homogénea de nucleolos. Se ha sugerido que este antígeno, puede ser el precursor ribosómico de las ribonucleoproteínas de bajo peso molecular, puesto que es sensible a la RNAasa, comúnmente se observa en la esclerosis sistémica progresiva.

En el patrón moteado se presentan múltiples puntos dentro del núcleo. Es atribuido a anticuerpos que reaccionan con antígenos

nucleares solubles en solución salina isotónica, y son llamados antígenos extraíbles del núcleo (ENA), también se les ha denominado antígenos nucleares ácidos no histonas y se subdividen en varios tipos: Sm (antígeno Smith un complejo proteína-RNA), SS-A (antígeno descrito anteriormente como Ro, contiene RNA y una parte protéica antigénica), SS-B (antígeno llamado La, constituido por partículas ribonucleoprotéicas) y se presentan en EMTC y LES (5).

El patrón moteado discreto es un autoanticuerpo específico para centrómero y se observa en Síndrome de Crest y Escleroderma.

Se han descrito inmunotinciones en el citoplasma las cuales corresponden a dos tipos de localización en organelos y dirigidos contra el citoesqueleto (7). Para entender esta última localización es necesario hacer una descripción de lo que es y de los constituyentes del citoesqueleto. Además, como se verá más adelante es el objeto principal de nuestro estudio en enfermedades autoinmunes (8).

EL CITOESQUELETO

A fines del siglo XVII, Malpighi describió por primera vez la estructura citoplasmática en las células de plantas. Posteriormente, en 1835 Dujardin la llamó "sarcoda" o gelatina viviente la cual poseía las características de: transparencia, insolubilidad en agua, y la capacidad de contraerse y de adherirse a las agujas de disección. Dujardin fue el primero que creyó que el ahora nombrado citoplasma, poseía propiedades inherentes de vida entre las que se encontraba, la contractilidad como la del músculo. El término Protoplasma fue introducido por Purkinje en 1839 y definido por Von Mohl en 1846, como el semilíquido viscoso granular de las células de plantas

diferente de la pared celular y del núcleo (6).

Una vez que se aclaró que el protoplasma era el sitio de múltiples procesos bioquímicos, y partiendo de algunas observaciones morfológicas, surgió la duda de que el protoplasma fuera totalmente líquido. Además la detección frecuente de estructuras en el protoplasma de las células de plantas, sugirió la presencia de cuando menos algunos componentes sólidos. Estas pocas ideas y aún pocas observaciones condujeron a las teorías "reticular y fibrilar" propuestas por Heitzman en 1873 y por Froman en 1880 respectivamente. Sin embargo, a pesar de esto, Berthold en 1886 y Bütschi en 1892, propusieron que las estructuras observadas en los protoplasmas fijados, solo representaban artefactos de fijación (6). Por otro lado, Hyman en 1917, describió diferencias en la estructura y consistencia del protoplasma de amibas, en términos coloidales distintos. Ella propuso que la corteza celular o "ectoplasma", poseía las propiedades de un gel, mientras que el protoplasma central o "endoplasma" poseía las propiedades de un sol de viscosidad variable (6).

Finalmente el término protoplasma fue sustituido por el término que ahora conocemos como citoplasma y que se define como un gel viscoelástico, tixotrópico de estructura variable (6). Por otro lado, la existencia de un arreglo fibroso en la estructura del citoplasma fue sugerida por Koltzoff en 1928 (7). El describió que todas las células son sistemas de componentes líquidos y esqueletos rígidos que generan la forma celular. De esta manera nació la idea y el nombre de "citoesqueleto", aunque se abandonó durante mucho tiempo por la falta de evidencias estructurales hasta que apareció la

microscopía electrónica. Por medio de técnicas especializadas de inmunocitoquímica, se logró verificar la presencia de estructuras fibrilares en el citoplasma. Actualmente mediante el uso de la microscopía electrónica de alto voltaje, se ha logrado visualizar la estructura tridimensional del citoesqueleto, el cual aparece como una extensa red de filamentos en la cual se encuentran incluidos los organelos citoplasmáticos (8).

El citoesqueleto de las células de tipo no muscular se encuentra formado por 3 tipos de estructuras filamentosas: 1) microtúbulos 2) microfilamentos y 3) filamentos intermedios, Figura No. 3.

1. Los microtúbulos tienen un diámetro de 240 \AA y varias micras de longitud. Están compuestos por la proteína tubulina, un heterodímero de 110-120,000 daltones de peso molecular que a su vez está formado por α y β tubulinas, con pesos moleculares de 57 y 55,000 daltones respectivamente. En mucho menor proporción los microtúbulos presentan un grupo de proteínas llamadas "MAPs" (proteínas asociadas a microtúbulos). La tubulina se agrupa como una línea de cuentas para formar un protofilamento. Los protofilamentos se agrupan uno al lado del otro para formar una verdadera columna que representa un micro**t**úbulo. Los microtúbulos están formados de 13 protofilamentos (9).

En los cilios y en los flagelos, los microtúbulos forman la parte central de su estructura, presentando un arreglo de nueve dobletes y dos singuletes (9).

2. Microfilamentos que constituyen el citoesqueleto, son los

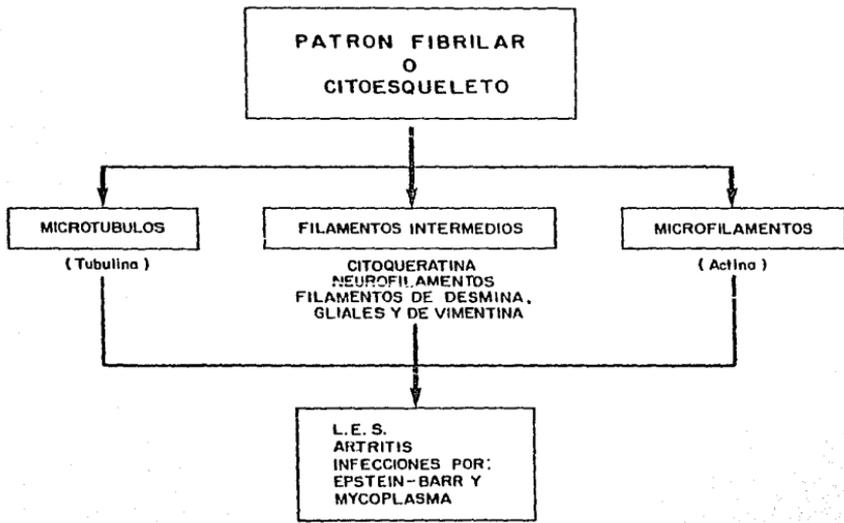


Figura No. 3. Tipos de estructuras fibrilares detectados por IFI en enfermedades autoinmunes.

inicialmente llamados filamentos finos, característicos del músculo sarcomérico (10). Este tipo de filamentos se ha encontrado en todas las células de tipo no muscular estudiadas, tienen un diámetro de 60-70 Å y su principal componente es la actina (11).

Dentro de la célula, la actina presenta diferentes grados de asociación. Se puede encontrar en forma globular monomérica, con un peso molecular de 43,000 daltones a la que se le ha dado el nombre de "actina G"; o se puede encontrar formando parte de un sistema complejo de estructuras filamentosas a la que se le ha denominado "actina F" (12). Estas estructuras se forman a partir de microfilamentos y pueden formar las llamadas fibras de tensión, pueden formar redes submembranales o verdaderas mallas a lo largo del citoplasma. Más aún, pueden formar la estructura central de organelos como es el caso de las microvellosidades intestinales (13). Se han descrito también fibras circulares y fibras en arco (14).

Edward Korn (12), propuso un esquema de flujo de las interacciones de algunas proteínas con la actina globular y la actina filamentosas (Fig. 4). En él se observa como algunas proteínas que se conocían hasta entonces, pueden de alguna manera modular las diferentes pozas de la actina y también controlar la formación de agregados supramoleculares de la actina. Sin embargo, en los últimos 8 años se han encontrado en diferentes tipos de células un gran número de proteínas que interaccionan con la actina, las cuales, en estudios de polimerización in vitro y estudios de viscosimetría parecen afectar ya sea formando agregados o rompiéndolos y de esta forma actuar como moduladores de los distintos estadios de la actina (15).

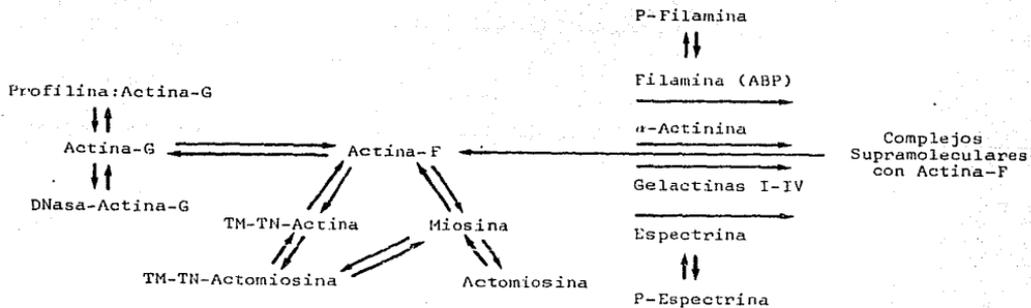


FIGURA No. 4. Formación de complejos supramoleculares de actina F. (12)

3. Filamentos Intermedios son llamados así, porque tienen un diámetro de 100 Å, el cual es intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos. Existen 5 clases de filamentos intermedios. Esta clasificación está dada por el tipo de proteína de la cual se encuentran constituidos y por el tipo de célula en la cual se encuentren.

a). Tonofilamentos o filamentos de queratina, están formados por un grupo de proteínas de peso molecular entre 40-65 Kd y se encuentran en las células de tipo epitelial o de origen epitelial.

b). Filamentos de desmina como su nombre lo indica, se encuentran formados por la proteína desmina de peso molecular entre 50-53 Kd, este tipo de filamentos se encuentran principalmente en músculo liso y cardíaco.

c). Filamentos de vimentina, se encuentran constituidos por la proteína vimentina, con peso molecular de 58 Kd, este tipo de filamentos se encuentran principalmente en las células de origen mesenquimatoso.

d). Filamentos gliales, formados por una proteína característica de 51 Kd, se encuentran en todas las células de origen glial.

e). Neurofilamentos, formados por tres proteínas de 200, 150 y 68 Kd, se encuentran en las neuronas.

En algunos tipos de células se han encontrado coexistiendo, 2 tipos de proteínas características de estas clases principales, pero no se tiene bien claro si ambas forman los filamentos o cada una --

forma un tipo característico de filamentos (16, 17). Para confirmar esto último se requerirá del uso de anticuerpos monoespecíficos y técnicas de inmunofluorescencia doble y microscopía electrónica con anticuerpos electrodensos. Los Filamentos Intermedios, que suelen ocupar la totalidad del citoplasma, se agrupan en ciertas células y en otras se distribuyen en filamentos sueltos.

En muchos tipos celulares, su organización parece estar relacionada con la de los microtúbulos (18, 19, 20, 21, 36).

En conclusión el citoesqueleto es básicamente una matriz fibrosa de proteínas que se extiende por el citoplasma entre el núcleo y la cara interna de la membrana plasmática. Se tienen evidencias de que esta matriz no es estática sino que lleva a cabo múltiples funciones dinámicas como: cambios en la forma, la división celular, citocinesis, endocitosis, exocitosis, etc. Muy probablemente toda esta serie de fenómenos dinámicos sean el resultado de una polimerización y despolimerización sincronizada de los componentes del citoesqueleto en el cual estén implicados factores regulatorios, esto último es el objeto actual de estudio de los investigadores del citoesqueleto (8).

ANTECEDENTES DIRECTOS

El estudio del citoesqueleto en las enfermedades autoinmunes por medio de IFI e inmunotransferencia ha revelado que hay anticuerpos dirigidos contra microfilamentos en hepatitis crónica activa (hepatitis autoinmune), AR y LES (21). Por otro lado en algunas enfermedades autoinmunes se han encontrado anticuerpos contra Tubulina como en LES, AR, Tiroiditis de Hashimoto y Síndrome de Sjögren (21).

En la mayor parte de los casos reportados en la literatura, los pacientes con enfermedades autoinmunes generan anticuerpos contra los filamentos intermedios, tales son los casos de LES, AR, hepatitis crónica activa (hepatitis autoinmune) y Síndrome de Sjögren (21-24).

Algunos estudios de LES presentan evidencias no muy claras de que los anticuerpos son dirigidos contra Vimentina 58 Kd (22, 23, 25, 26). Ahora bien, en estudios tendientes a determinar cual es el tipo ó tipos principales de inmunoglobulinas involucradas en la respuesta autoinmune, se ha encontrado que la que más comúnmente se une al antígeno es la IgG y en menor proporción la IgM (23, 24). En otros estudios se encontró que la que se une en mayor proporción es la IgM (25, 26, 27).

Recientemente se ha tratado de esclarecer la etiología de la producción de anticuerpos contra los Filamentos Intermedios y se propone que es consecuencia del daño celular ocurrido en el fenómeno

autoinmune y el proceso inflamatorio que afecta a estos pacientes, y que el estímulo para la producción de anticuerpos contra filamentos de vimentina y citoqueratinas puede ser derivado de la destrucción de los filamentos de vimentina que contienen las células como los linfocitos, las células del revestimiento sinovial así como las células que contienen filamentos de citoqueratinas como los hepatocitos y las células epiteliales de las glándulas exocrinas (24).

JUSTIFICACION DEL TRABAJO

En México no se había hecho un estudio actual en las enfermedades autoinmunes, respecto a la reactividad de los sueros de pacientes con enfermedades catalogadas como tales por lo que se trató de hacerlo.

Dentro de las determinaciones de IFI en células HEp-2 apareció un patrón que no se había observado ya que en el tipo de sustrato utilizado en forma rutinaria (células de hígado de rata), nunca se presentó.

Cuando inicialmente se utilizaron las células HEp-2 los tiempos de fijación y los fijadores no eran los adecuados hasta que se estandarizó la manera de fijar estas células. Tal patrón es el denominado fibrilar, que como vimos en la introducción corresponde al citoesqueleto. Además no se sabía con exactitud de que tipo ó tipos de filamentos se trataba.

Un análisis de la literatura y experimentos con drogas que afectan al citoesqueleto nos orientaron a pensar que se trataba de filamentos intermedios.

Como antecedente se debe mencionar que la mayor población de enfermedades autoinmunes que se analizaron esta representada por el lupus eritematoso sistémico (LES) en 60% y artritis reumatoide (AR) en 22.9%, de tal manera que en este estudio era de esperarse

que la mayoría de los sueros colectados de los pacientes fueran de LES.

En la mayoría de los casos reportados los autores utilizaron como sustrato para probar los sueros, a líneas celulares que corresponden a fibroblastos de piel de humano los cuales se sabe que solo contienen vimentina y sus productos de degradación y que como se mencionó anteriormente no es el único componente de los filamentos intermedios por lo que no se puede excluir que existan anticuerpos contra los otros componentes de éstos filamentos. Además la mayoría de los autores realizaron análisis electroforéticos de las proteínas en geles de poliacrilamida unidimensionales y esto de ninguna manera descarta el hecho de que los anticuerpos estén dirigidos contra varias proteínas, ya que en la electroforesis en una dimensión es muy difícil distinguir si existe una sola proteína o varias en una sola banda. Por lo que se requiere de un análisis electroforético bidimensional en donde se separan las proteínas por su peso molecular y su punto isoeléctrico.

La importancia de este trabajo, consiste en tener las bases para poder efectuar un estudio, más profundo en lo que se refiere a pacientes de LES y de otras enfermedades autoinmunes para de esta manera buscar si existe alguna correlación entre la presencia de anticuerpos contra filamentos intermedios y las manifestaciones clínicas del paciente.

OBJETIVOS

Estandarizar el método de IFI con células HEP-2 para la detección de anticuerpos contra el citoesqueleto en enfermedades autoinmunes.

Estandarizar el método y la concentración adecuada de colchicina para provocar el rearrreglo del citoesqueleto.

Encontrar las concentraciones adecuadas para la determinación de ELISA, cuando se utiliza como antígeno citoesqueletos-tritón.

Análisis de la frecuencia en la que se presentan los patrones de Filamentos Intermedios en los sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Identificación del tipo de inmunoglobulinas y la proteína o proteínas contra las cuales están dirigidos estos anticuerpos, mediante las técnicas de ELISA e inmunotransferencia.

Análisis bidimensional para corroborar con mayor exactitud de que proteínas se trata.

MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras

Se emplearon 1000 sueros de los cuales 600 fueron de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y los restantes de otras enfermedades como artritis reumatoide (AR), Raynaud, enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), escleroderma sistémica progresiva (ESP), Crest, dermatomiositis (DM), anemia hemolítica autoinmune (AHA). Estos pacientes fueron diagnosticados en la consulta externa del Servicio de Reumatología del Centro Médico "La Raza", los cuales se registraron con claves que incluyen nombre, sexo, edad y diagnóstico.

Controles

Utilizamos 21 sueros donados por el Banco de Sangre del Centro Médico "La Raza". Estos sueros fueron sometidos por el mismo banco a las siguientes pruebas: Brucela, VDRL, SIDA, Hepatitis B, TORCH (Toxoplasma, Rubéola, Citomegalovirus, HERPES) y aparentemente los donadores no presentaban datos clínicos y de laboratorio de algún tipo de enfermedad autoinmune. Se comprobó su negatividad en AAN por la técnica de IFI después de haber obtenido los sueros. Por las razones anteriores fueron considerados "controles negativos".

Células

Línea celular HEP-2 (células de carcinoma de laringe humano).

Estas células de origen epitelial fueron establecidas por A.E. Moore y H.W. Toolan en 1952 (Certified Cell Lines pág. 47 y 48).

Para este trabajo fueron proporcionadas por el M. en C. Pedro García Bañuelos y por el Laboratorio de Virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Antiglobulinas Humanas

i) Preparadas en conejo y marcadas con isotiocianato de fluoresceína (Behring Marburg W. Germany)

ii) Preparadas en cabra marcadas con peroxidasa (Sigma Chemical Company, St. Louis, M.O., U.S.A.).

Suero de Ternera

Para el medio de cultivo, se obtuvo de In Vitro, S.A.. El suero de Colorado Serum Company se utilizó para bloqueo de sitios. Denver, Colorado, U.S.A.

MATERIAL Y SOLUCIONES

-Tris (Trizma-Base), Tritón X-100 (octil-fenoxi-polietoxi-etanol), Tween 20 (monolaurato de polioxietilen sorbitan), Acido cítrico, o-fenilendiamina, $NiCl_2$ (cloruro de níquel), $CoCl_2$ (cloruro de cobalto), DAB (3,3'-diaminobenzidina), OsO_4 (tetraóxido de osmio), Glicina, NP-40 (octil-fenol-etilen-óxido) y Azul de Coomassie R-250. Se obtuvieron de Sigma Chemical Company, St. Louis, M.O., U.S.A.

-NaCl (cloruro de sodio), $MgCl_2$ (cloruro de magnesio), KCl (clo

ruro de potasio), H_2SO_4 (ácido sulfúrico), Etanol Absoluto (grado analítico), Acetona (grado analítico). Se obtuvieron de Baker Analyzed, J.T. Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México.

-TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina), Persulfato de Amonio, β -Mercaptoetanol, Acrilamida, Bisacrilamida, Papel de nitro-celulosa Trans-Blot Transfer Medium. Se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories. Richmond, California, U.S.A.

- H_2O_2 (agua oxigenada) al 30% y el H_3PO_4 (ácido fosfórico). Se obtuvieron de Merck. E. Merck, Darmstadt, Germany.

-SDS (dodecil sulfato de sodio). Se obtuvo de BDH Laboratory Reagents. Poole England.

-Urea (ultra pura). Se obtuvo de Schwarz/Mann Biotech. Orangeburg N.Y.

-Placas para ELISA. Plaque Nunc-Immuno I. Apparatus Reagents. Se obtuvieron de Thomas Scientific. Denmark.

El colorante Azul de Coomassie G-250. Se obtuvo de Pierce Chemical Company. Rockford, Illinois, U.S.A.

Metanol y ácido acético. Se obtuvieron de la marca Comercial Analit Reactivo. Química Dinámica, S.A. de C.V. Monterrey, N.L. México.

Solución de PBS-A

Contiene las siguientes soluciones concentradas, y la cantidad que utilizamos para un litro: NaCl 5.0 M 27.4 ml, KH_2PO_4 1 M 1.5 ml,

Na_2HPO_4 0.5 M 16.2 ml, KCl 1 M 2.7 ml, de tal manera que las concentraciones finales de NaCl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y KCl fueron: 137 mM, 1.5 mM, 8.1 mM, 2.7 mM respectivamente. Estos reactivos se obtuvieron de J.T. Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México.

NaCl	5.0 M	27.4 ml
KH_2PO_4	1 M	1.5 ml
Na_2HPO_4	0.5 M	16.2 ml
KCl	1 M	2.7 ml

Solución de PBS-Tween 0.05%

Contiene las soluciones anteriores y con las mismas concentraciones más 5 ml de tween 20 al 10%.

Versenato de Sodio (EDTA)

Esta solución se preparó al 0.05% en PBS-A. Y la mezcla de tripsina-verseno contiene 0.25 ml de solución de tripsina en 10 ml de solución de verseno. Se obtuvo de J.T. Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México.

La tripsina se empleó al 0.25% en EDTA a $\text{pH} = 7.8$. Y el medio basal Eagle (15 g/1 l). Se obtuvieron en Laboratorios Gibco. Grand Island, New York. U.S.A.

Antibióticos

La concentración final de antibióticos que se empleó en el medio de cultivo fue de 100 UI/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycinina (PES).

Colchicina (Liofilizado)

Se hidrató con 10 ml de agua estéril y la concentración final a la que se utilizó fue de 5 µg/ml. Se obtuvo de Laboratorios Gibco Grand Island, New York, U.S.A.

Glutamina

Se utilizaron 10 ml de glutamina a 2 mM por cada litro de medio. Se obtuvo de Laboratorios Gibco. Grand Island, New York, U.S.A.

Solución de Bradford

La solución contiene 100 mg de colorante Azul de Coomassie G-250, 50 ml de Etanol absoluto y 100 ml H_3PO_4 (85%) por cada litro de solución.

Solución para teñir Geles de Poliacrilámda

La solución es la descrita por Cleveland (33), la cual contiene Azul de Coomassie R-250 al 0.1%, Metanol al 50% y Acido acético al 10%.

Solución Amortiguadora de Transferencia

Contiene: tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%.

Solución NiCo

Esta solución de acuerdo al procedimiento de Towbin (34) contiene 10 mg de $NiCl_2$ y 10 mg de $CoCl_2$ por 1 ml de solución.

Solución DAB

Esta solución contiene 50 mg de DAB por cada 100 ml de fosfatos 50 mM.

Solución H_2O_2 al 0.01%

De una solución de H_2O_2 al 30%. Tomamos 33 μ l de esta y la llevamos a 1 ml con H_2O .

Solución DAB-NiCo- H_2O_2

Contiene 40 ml de DAB al cual se le adicionaron lentamente 1.2 ml de NiCo y 200 μ l de H_2O_2 al 0.01%.

METODOS

Subcultivo

Las células HEP-2 se mantuvieron a 37°C en una atmósfera controlada de CO₂ (90% aire + 10% CO₂). A partir de una botella de 50 cm² de superficie con células HEP-2 al 100% de confluencia, se descartó el medio de cultivo por el lado opuesto a la monocapa celular. Se adicionaron 3 ml de la mezcla tripsina-verseno, se dejaron actuar de 10-15 seg hasta observar la opacidad del tejido, se descartó la mezcla por el lado opuesto a la monocapa se incubó el cultivo con el residuo de la mezcla a 37°C de 5-10 minutos, una vez desprendida la monocapa, se agregaron 6 ml de medio basal Eagle completo (BME + 10% de suero de ternera + 1% de glutamina + 4.4% Na₂CO₃), se obtuvo una suspensión celular, la cual se utilizó para lo siguiente; por un lado para mantener el cultivo celular, esto se realizó en una botella de 50 cm² a una dilución de 1:6, con esta suspensión celular y medio basal Eagle completo, se incubó aproximadamente 48 horas para subcultivos posteriores, por otro lado se adicionó el resto de la suspensión celular en una dilución de 1:9 a dos cajas de petri de 63 cm² de superficie que contenían dos portaobjetos, se incubaron 24 horas aproximadamente. Estas células de los portaobjetos se emplearon como sustrato en la técnica de IFI ver Figura No. 5.

Preparación de Laminillas para IFI

Después de tener las laminillas con células en confluencia (a

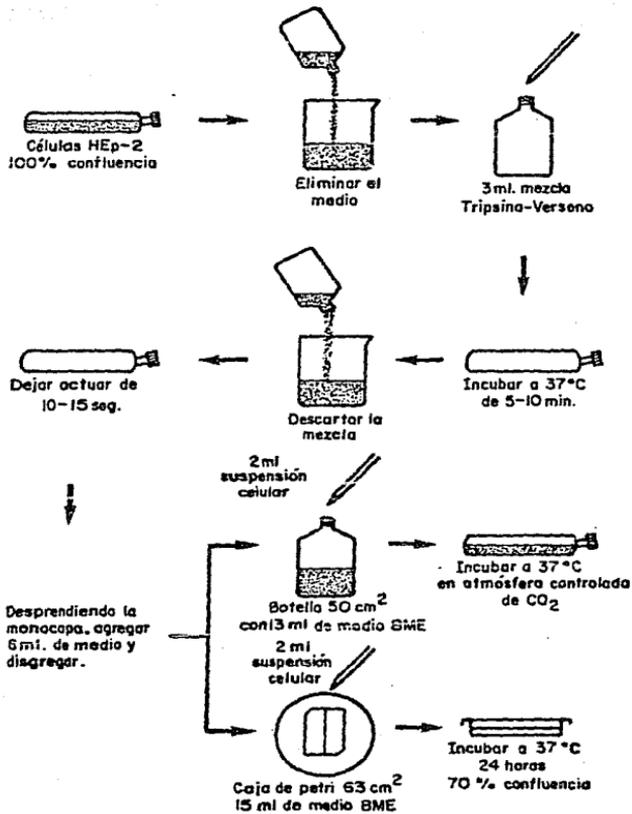


Figura No. 5. Técnica de Subcultivo

aproximadamente 48 horas de crecimiento), se lavaron las laminillas con PBS-A para eliminar el exceso de medio, se dejaron secar completamente y con acetona a -20°C se fijaron las células durante 10 minutos a T.A. Se dejaron secar y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

METODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Con este método se detectó la presencia de anticuerpos antinucleares (AAN) en los sueros de pacientes. Se realizaron diluciones 1:16, 1:64, 1:256 de los sueros a probar con PBS-A. A cada laminilla con células HEp-2 se le hicieron pozos con lápiz de diamante, se les adicionaron las diluciones del suero antes mencionadas. Se incubaron durante 30 minutos en cámara húmeda, se enjuagaron las laminillas y se lavaron tres veces con PBS-A durante 10 minutos en cada lavado, para eliminar el exceso de suero. Enseguida se cubrieron las laminillas con suero de conejo con antiglobulinas humanas (polivalente anti-IgG, IgM, IgA) marcadas con isotiocianato de fluoresceína y azul de Evans para eliminar la inmunofluorescencia inespecífica. Se incubaron por 30 minutos en la cámara húmeda, se enjuagaron nuevamente las laminillas para eliminar el exceso de γ -globulinas y se lavaron tres veces con PBS-A durante 10 minutos cada lavado. Se limpió el exceso de PBS-A con una gasa y finalmente se montaron las laminillas con solución de montaje (glicerol + PBS-A). Las observaciones de las laminillas se realizaron en un microscopio de cámara invertido Carl Zeiss, Modelo ICM-405 equipado para epifluorescencia (28).

Preparación de Laminillas con Rearreglo del Citoesqueleto

Este procedimiento es la simplificación de las técnicas empleadas por otros autores como P. Kurki (24), Andres Alcover (23, 25), Senecal (26).

Inicialmente se realizaron varios experimentos con el fin de estandarizar la técnica en los cuales utilizamos varias concentraciones y diferentes tiempos de incubación. Se observó que las condiciones donde se tenía un mejor rearrreglo de los filamentos intermedios, fueron las siguientes: en una caja de petri con laminillas de las células HEp-2 a 60% de confluencia se adicionaron 5 µg/ml de colchicina, se incubaron durante 2 horas a 37°C, se descartó el medio de cultivo con colchicina, se enjuagaron las laminillas con PBS-A y se dejaron secar. Se fijaron las células con acetona a -20°C durante 10 minutos a T.A., y se dejaron secar para realizar la técnica de IFI ver Figura No. 6.

Extracción de los Filamentos Intermedios de las Células HEp-2

Se siguió el procedimiento descrito por Allen M. Gown y Arthur M. Vogel (19).

Se partió de 20 cajas de petri con el 60% de confluencia, se lavaron dos veces con 10 ml de solución amortiguadora de TNM (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM a pH= 7.6). A continuación se incubaron con 1% de Tritón X-100 en solución amortiguadora de TNM por un minuto a T.A., se lavaron dos veces con solución amortiguadora de TNM y se incubaron por 30 minutos a T.A. con una solución de 0.5% de Tritón X-100 y 1.5 M de KCl. Enseguida se lavaron dos veces con solución amortiguadora de TNM, se despegaron los filamentos con policfa, se resuspendió lo colectado en TNM y se centrifugó a

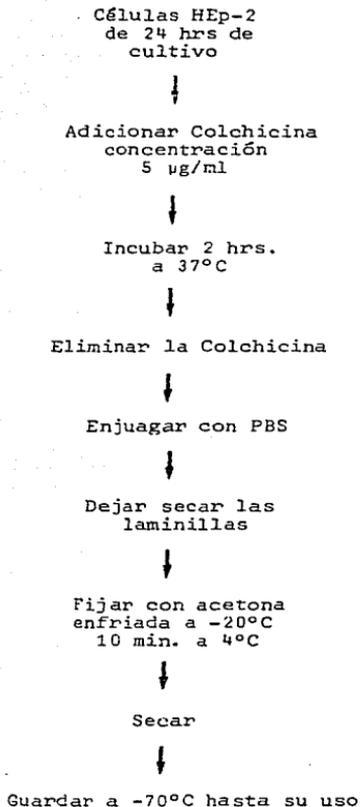


Figura No. 6. Obtención de Laminillas con rearreglo del Citoesqueleto para IFI

10,000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 μ l de una solución que contiene 1% de SDS y 50 mM de Tris a pH= 6.8.

Posteriormente se trató de acuerdo al procedimiento descrito por J.I. Garrels (29).

En el cual se adicionó 1/20 del volumen de la muestra de nucleasa estafilocócica en H₂O de una concentración de 1 mg/ml, se incubó en hielo durante 15 minutos, y se adicionó 1/10 del volumen de la muestra de nucleasa y RNAasa (DNAasa I 1 mg/ml, RNAasa 0.5 mg/ml, MgCl₂ 50 mM, Tris 0.5 M a pH= 7.0), se incubó 10 minutos en hielo y finalmente se guardaron las muestras a -20°C en partes alícuotas hasta su uso.

Cuantificación de Proteínas

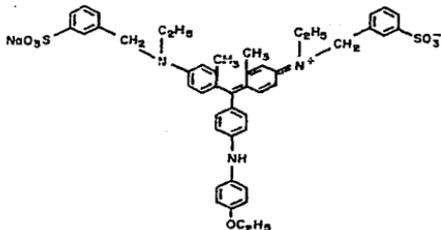
Fundamento

La técnica de Bradford es un método rápido y muy sensible para la cuantificación de proteínas.

Este método está basado en la observación del azul de Coomassie G-250 el cual en su forma inicial es de color rojo, el cual cambia a color azul cuando el anión interactúa con los grupos NH₃⁺ de las proteínas.

Una ventaja de este método es que el azul de Coomassie G-250 no reacciona con aminoácidos libres ni con péptidos muy pequeños, haciendo posible la determinación de concentración de proteínas de células de extracto crudo no dializadas. Por este método se puede

detectar menos de 1 μg de proteína (30).



Para la cuantificación de proteínas, se hizo una curva estándar con diferentes concentraciones de albúmina sérica de bovino (BSA) Sigma Chemical Company. St. Louis, M.O. U.S.A., la cual estaba disuelta en NaCl 0.15 M a una concentración de 2 mg/ml.

A continuación cada una de las muestras a determinar, se ajustó a un volumen final de 100 μl con NaCl 0.15 M y se adicionó a cada una 5 ml de solución de Bradford. Las lecturas de D.0 se realizaron a 595 nm, en un fotocolorímetro Bausch & Lomb Modelo 33-30-41.

Para saber la concentración de proteína de cada una de las muestras, se correlacionó la absorción obtenida con la proteína en una curva estándar.

ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)

Técnica Inmunoenzimática en Fase Sólida

Este procedimiento se siguió de lo descrito por G. Wolters (31).

En una caja de 96 pozos, con una recubierta especial para in-muoadsorción, se cubrió cada pozo con 200 μ l de extracto de filamentos intermedios de HEp-2 a una concentración de 0.3 μ g/ μ l de proteína que se utilizó como antígeno. Se necesitaron 400 μ g en 20 ml de Bi-Car a pH= 7.6 (1.56 g de Na_2CO_3 + 2.93 g de NaHCO_3 en un litro de agua bidestilada) por placa. Se incubaron 4 horas a T.A. se eliminó el antígeno no unido y se bloquearon los sitios libres con 20% de suero Colorado en PBS-Tween 0.05% durante 30 minutos a T.A. Después se lavaron con PBS-Tween 0.05% 3 veces, 3 minutos cada vez. Se adicionaron 100 μ l del suero del paciente (1er anticuerpo) a cada pozo a una dilución de 1:50 (diluido en PBS-Tween 0.05% + 20% suero Colorado) durante toda la noche a 4°C. Enseguida se lavaron nuevamente con PBS-Tween 0.05% 3 veces, 3 minutos cada vez y se pusieron 100 μ l en cada pozo del 2º anticuerpo GAH-P (conjugado de inmunoglobulinas anti-humanas polivalentes marcadas con peroxidasa) en una dilución 1:1000 con PBS-Tween 0.05% + 20% suero Colorado, se incubaron durante 3 horas a T.A. Se lavaron con PBS-Tween 0.05% 3 veces durante 3 minutos en cada lavado y se pusieron en cada pozo 200 μ l de sustrato el cual contiene ácido cítrico 0.1 M 6.0 ml, Na_2HPO_4 0.2 M 6.4 ml, H_2O 12.5 ml, o-fenilendiamina 10 mg, H_2O_2 30% 10 μ l, por cada 25 ml, que es lo requerido para el análisis de una caja. Se permitió que la reacción enzimática se lleve a cabo durante 15 minutos en obscuridad y se detuvo la reacción con una gota de H_2SO_4 4N. Por último se leyó en un espectrofotómetro la absorbancia a 492 nm.

Electroforesis Unidimensional

1. Preparación de las muestras

En la mayor parte de los casos, las muestras a ser analizadas por electroforesis, fueron liofilizadas y posteriormente disueltas en la solución de Laemmli (32) para muestras compuestas por rojo de fenol $2.8 \times 10^{-5} M$, SDS al 2%, glicerol al 10% y tris-HCl 0.6 M pH= 6.8. A continuación se ajustaron a una concentración final de 5% de β -Mercaptoetanol y 8M de urea se calentaron a 100°C por un minuto y después que alcanzaron la temperatura ambiente se aplicaron a los geles; la cantidad de proteína que se aplicó por gel fue de 1 mg de extracto de filamentos intermedios de células HEP-2 para geles de tipo preparativo.

2. Preparación de los geles y condiciones para la electroforesis.

La electroforesis unidimensional se hizo en geles planos de poliacrilamida de 14 x 14 cm y 1.5 cm de espesor, preparados de acuerdo con el procedimiento que describió Laemmli (32).

El gel separador se preparó a las concentraciones finales siguientes: acrilamida 10%, bisacrilamida 0.27%, urea 8 M, SDS 0.1% y tris-HCl 0.38 M de pH= 8.8.

La polimerización del gel se logró al agregar el persulfato de amonio al 0.06% y TEMED al 0.08%. El gel concentrador se preparó con las concentraciones finales siguientes: acrilamida 5%, bisacrilamida 0.14%, urea 8 M, SDS 0.1%, tris-HCl 0.125 M de pH= 6.8. Para polimerizar el gel se adicionaron persulfato de amonio y TEMED a las concentraciones finales de 0.05% y 0.01% respectivamente. La

electroforesis se hizo a 100 voltios durante el tiempo necesario para que el colorante usado como marcador llegara a un centímetro de la base del gel.

Electroforesis Bidimensional

1. Preparación de las muestras

Las muestras para la electroforesis en dos dimensiones se liofilizaron y resuspendieron en la solución "A" de O'Farrel (33), compuesta por: urea 9.5 M, NP-40 al 2%, β -mercaptoetanol al 5% y una mezcla de anfolinas (pH= 3-10 y 5-7) al 2%. La cantidad de proteína que se aplicó a los geles de enfoque isoeléctrico fue de 100 μ g por cada gel cilíndrico.

2. Preparación de los geles y condiciones para la electroforesis.

La electroforesis bidimensional se hizo en geles de poliacrilamida de acuerdo al procedimiento descrito por O'Farrel (33). Los geles cilíndricos para enfoque isoeléctrico median 12.5 cm y 20 cm de largo por 3 mm de diámetro. La composición de los geles fue la siguiente: urea 9.16 M, acrilamida 3.7%, bisacrilamida 0.02%, NP-40 2% y 0.1% de anfolinas de un rango de pH= 3-10 y 5-7. La polimerización de los geles se catalizó cuando se agregó persulfato de amonio y TEMED a las concentraciones finales de 0.01% y 0.07% respectivamente. Durante la polimerización de los geles se pusieron 20 μ l de urea 8M sobre la superficie de la mezcla y se dejaron polimerizar por espacio de una a dos horas. Después se reemplazó la urea 8M por la solución "A" de O'Farrell y sobre ésta se pusieron 10 μ l de

H₂O bidestilada. Al término de una a dos horas, se puso nueva solución "A" y se agregaron las soluciones del ánodo y del cátodo.

Para el ánodo se utilizó NaOH 0.02 M, desgasificada y para el cátodo H₃PO₄ 0.01 M. Los geles se precorrieron 15 minutos a 200 voltios, 30 minutos a 400 voltios y 30 minutos a 600 voltios. Enseguida se retiró la solución de NaOH y la solución "A" se aplicaron las muestras y sobre de éstas se adicionaron 10 µl de solución K (urea 9.0 M y anfolinas 0.05%). La cámara se volvió a llenar con NaOH 0.2 M y la electroforesis se desarrolló a 600 voltios 15 horas y a 800 voltios una hora.

Cuando terminó la electroforesis, los geles se sacaron de los tubos por medio de presión de aire con una jeringa; a continuación los geles se equilibraron con 10 ml de solución "O" de O'Farrel (Tris-HCl 0.0625 M, pH= 6.8, 2-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y SDS al 2.3%) por espacio de una hora, se retiró la solución "O" y los geles se guardaron a -70°C hasta que se usaron para el fraccionamiento en la segunda dimensión. Los geles que se utilizaron en la segunda dimensión se prepararon en las mismas condiciones que se describieron para el fraccionamiento en una sola dimensión. El gel cilíndrico se unió con el gel plano mediante agarosa al 1% en solución "O" y se corrió en las mismas condiciones de los geles para el fraccionamiento en una dimensión, excepto que al amortiguador de la cámara superior se le adicionaron unas gotas de azul de bromofenol concentrado como colorante marcador de frente de migración electroforética.

Detección de las Proteínas

1. Tinción de los geles

Después de la electroforesis en una o dos dimensiones. Algunos de los geles se tificaron por 30 minutos con solución de azul de Coomassie y se destificaron con varios cambios de ácido acético al 10% y metanol al 5%, de acuerdo al procedimiento de Cleveland (34).

Electrotransferencia

Este procedimiento fue descrito por Towbin *et al.* (35). Los geles para electrotransferencia se incubaron dos veces con solución amortiguadora de transferencia durante 30 minutos. Se cortó el papel de nitrocelulosa y el papel Whatman al tamaño de los geles. La medida del gel fue 14.5 cm x 16 cm, se puso el papel de nitrocelulosa en solución amortiguadora de transferencia por una hora. Se cubrió una charola con la misma solución amortiguadora se sumergió una rejilla de la cámara, se puso sobre la misma la fibra scotch, posteriormente se colocó el papel Whatman, después el papel de nitrocelulosa y luego el gel y por último el otro papel Whatman, se colocó la segunda rejilla, y se cerraron las rejillas para formar un emparedado. No debe tener ninguna burbuja entre papel y papel y gel. El emparedado debe quedar sumergido en la cámara de electroforesis y orientado de tal manera que el gel esté hacia el cátodo y el papel de nitrocelulosa hacia el ánodo, la cámara se adaptó a un baño circulador con temperatura constante de -5°C y se hizo la transferencia durante 2 horas a 1.2 voltios. Se sacó el emparedado y se marcó el papel de nitrocelulosa de la misma manera que estaba colocado el gel. Se guardó el papel de nitrocelulosa entre papel Whatman y en

papel aluminio a -70°C hasta su uso (35).

Tinción del papel de nitrocelulosa con anticuerpos

Este procedimiento fue descrito por Towbin (35), con varias modificaciones, con el fin de evitar inespecificidad.

Los papeles con proteínas transferidas fueron marcados con lápiz en la parte de abajo. Se enmascararon los sitios de unión, con PBS-tween 0.05% + 20% de suero Colorado durante 60 minutos a 37°C . Se lavaron 3 veces con PBS-A durante 5 minutos cada lavado. Se incubaron con el suero del paciente, a una dilución 1:4 con PBS-tween 0.05% + 20% suero Colorado durante toda la noche a 4°C con agitación. Se lavaron 10 minutos con PBS-A, 10 minutos con PBS-tween 0.05% y nuevamente 10 minutos con PBS-A. Se incubaron con GAH-P (conjugado de antiglobulinas humanas con peroxidasa preparada en cabra), diluido 1:2000 en PBS-tween 0.05% + 20% suero de Colorado durante 1 hora a T.A. Se lavaron 10 minutos en PBS-A, 10 minutos con PBS-tween 0.05% y 10 minutos con PBS-A. Se lavaron 2 veces con 50 mM de fosfatos 5 minutos cada lavado. Se incubaron con 40 ml de la solución DAB y 1.2 ml de la solución NiCo durante 10 minutos a T.A. Posteriormente se incubaron con DAB-NiCo- H_2O_2 durante 10 minutos a T.A. Se lavaron 4 veces con 50 mM de fosfatos por 5 minutos a T.A. A continuación se lavaron 2 veces con H_2O 5 minutos cada vez a T.A. Se pasaron rápidamente por O_5O_4 al 0.01% en H_2O . Por último se lavaron 3 veces con H_2O por 5 minutos a T.A. Se dejaron secar.

RESULTADOS

ANALISIS DE IFI EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

De los 1000 sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes recolectados durante dos años, 500 provenían de pacientes con LES, 229 de AR y el resto correspondieron a las otras enfermedades autoinmunes como se muestra en la Tabla No. 1. Además en la misma tabla observamos el porcentaje de pacientes que presentaron anticuerpos contra el citoesqueleto con respecto al total de pacientes que presentaron cada enfermedad 1 de cada 4 de estos pacientes con LES presentaron anticuerpos contra citoesqueleto. El resto de pacientes de LES presentaron patrones anti-núcleo.

Los datos del número de pacientes y de la dilución a la cual se observan los patrones anti-citoesqueleto en IFI para las enfermedades de LES y AR se encuentran representados en la Tabla No. 2, donde la mayor población de pacientes se encuentra en la dilución 1:64.

Respecto de las otras enfermedades autoinmunes el porcentaje de anticuerpos anti-citoesqueleto fue muy bajo y no se presentó en todas (ver Tabla No. 1), por lo que hacer un estudio de éstas no resultaría representativo.

Con base en lo anterior y tomando en cuenta que la mayor incidencia de enfermedades autoinmunes son LES y AR, nuestro estudio

TABLA No. 1

ANTICUERPOS CONTRA CITOESQUELETO EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES
DETERMINADOS POR IFI EN CELULAS HEP-2

Diagnóstico	No. de Pacientes Totales	% de Pacientes que Presentaron Ac contra el Citoesqueleto en cada enfermedad
LES	600	25%
AR	229	4.3%
ARJ	79	6.3%
EMTC	29	No Presentaron
ESP	26	3.8%
Raynaud	20	5%
DM	9	No Presentaron
AHA	5	16.6%
Crest	2	No Presentaron
Controles	21	No Presentaron

TABLA No. 2

ANTICUERPOS CONTRA EL CITOESQUELETO EN LUPUS ERITEMATOSO
SISTÉMICO Y ARTRITIS REUMATOIDE POR IFI EN CELULAS HEP-2

Diagnóstico	Título por IFI (anticuerpos polivalentes conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína)	No. de Pacientes con este título
LES (150)	1:16	35
	1:64	109
	1:256	6
AR (229)	1:16	59
	1:64	171
Controles (21)*	NEG	-

* La IFI en los controles se hizo con una dilución del suero 1:16

Se consideraron positivos a los sueros que tenían un título desde 1:16 en IFI.

se dirigió hacia el análisis principalmente de LES ya que esta enfermedad pone en juego la vida de los pacientes la mayoría de las veces. (Las características principales de esta enfermedad se pueden ver resumidas en el apéndice No. I).

ESTUDIO DE ELISA EN LES Y AR

Se hizo un estudio de ELISA con cada uno de los pacientes de LES y AR, se utilizaron extractos de citoesqueleto (citoesqueletos-tritón) como antígeno y una dilución de 1:50 de los sueros de pacientes. De los 150 sueros de pacientes con LES, 133 fueron positivos en ELISA, mientras en AR de los 229 sueros 200 resultaron positivos.

A continuación se hizo un análisis más profundo solo con LES, debido a las dificultades en el seguimiento de pacientes y a la obtención restringida de sueros (cuando hablamos de restringido nos referimos a la cantidad de suero y al hecho de que en los pacientes se puede reducir el título por el tratamiento), además de lo costoso que resulta un estudio con anticuerpos específicos, electroforesis e isoelectroenfoque.

DETERMINACION DEL TIPO DE INMUNOGLOBULINA

Los 150 sueros de los pacientes que tuvieron anticuerpos contra el citoesqueleto, fueron sometidos nuevamente a la prueba de IFI con anticuerpos monovalentes conjugados con isotiocianato de fluoresceína, para determinar el tipo de inmunoglobulina que interaccionó con el antígeno. El 98% (130 pacientes) reconocieron

el citoesqueleto con la inmunoglobulina IgM y el otro 2% con IgG. Los controles no presentaron fluorescencia.

TRATAMIENTO DE LAMINILLAS CON DROGAS

Con el fin de saber que tipo de estructura fibrilar del citoesqueleto reconocen los anticuerpos de estos pacientes se prepararon laminillas con células HEP-2 de 24 horas de crecimiento las cuales fueron tratadas con colchicina. Se conoce que esta droga provoca que los filamentos intermedios (compuestos de vimentina) se dirijan hacia la zona perinuclear (36), mientras que el efecto sobre los microtúbulos es inhibir la polimerización de la tubulina con lo que también se inhibe la división celular (37, 38).

Una tinción característica de células tratadas con colchicina reconocidas con el suero del paciente No. 1 se muestra en la Figura 1b en la cual podemos observar una distribución perinuclear condición que corresponde a los filamentos intermedios compuestos de vimentina.

Con el fin de determinar cual era la concentración "adecuada" en la que se obtenía el mejor rearrreglo, se realizaron varios experimentos y resultó que, una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colchicina y una incubación de 2 hrs a 37°C fueron las condiciones finalmente adoptadas.

Los experimentos siguientes los realizamos solamente con 6 sueros de pacientes con lupus eritematoso que en las pruebas preliminares fueron los que presentaron mayor título (1:256) en la prueba

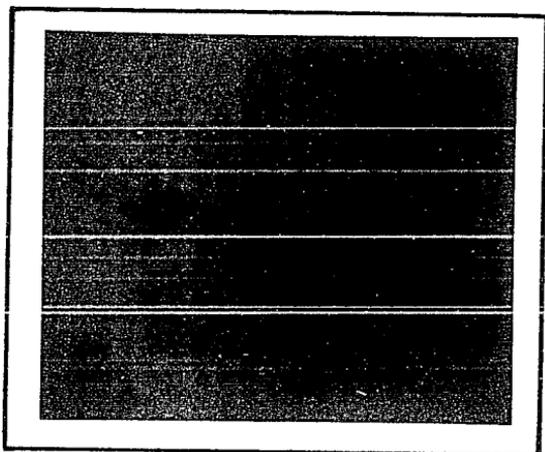


Figura Ia

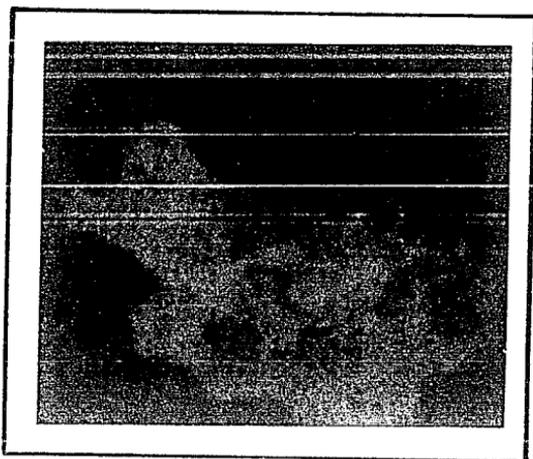


Figura Ib

Figura Ia. Inmunofluorescencia Indirecta de las células HEp-2, teñidas con el suero del paciente No. 1.

Figura Ib. Inmunofluorescencia Indirecta de las células HEp-2 tratadas con colchicina, teñidas por el suero del paciente No. 1. El tratamiento con colchicina fue de 5 μ g/ml durante 2 horas.

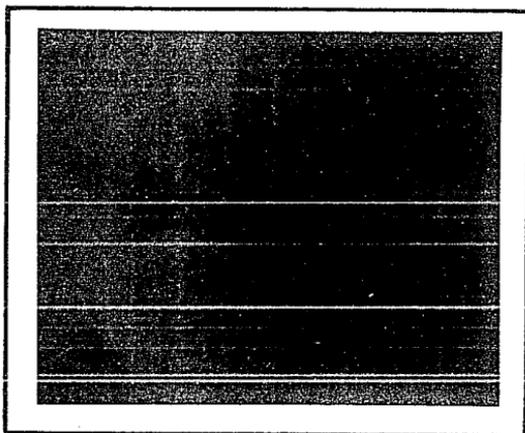


Figura Ia

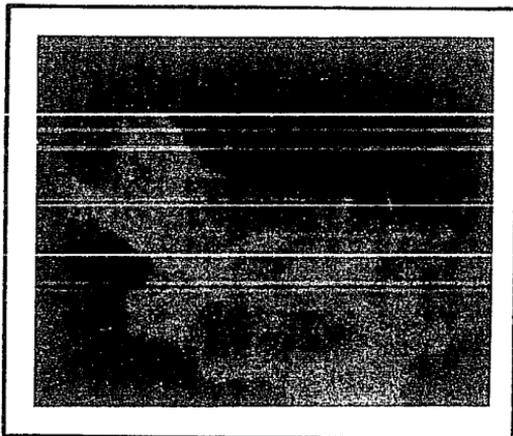


Figura Ib

Figura Ic y Id. Inmunofluorescencia indirecta de las células HEp-2, teñidas con el anticuerpo monoclonal que reconoce los 5 tipos de filamentos intermedios.

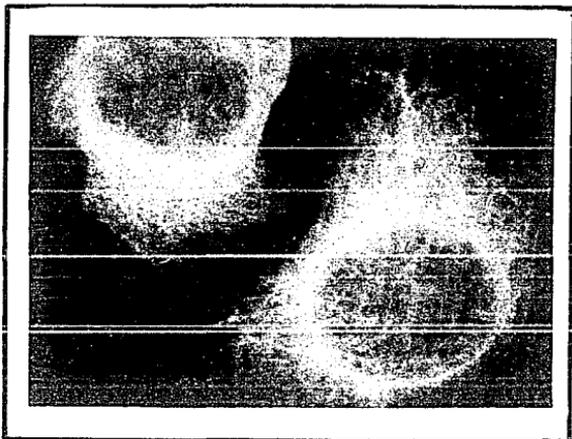


Figura Ic

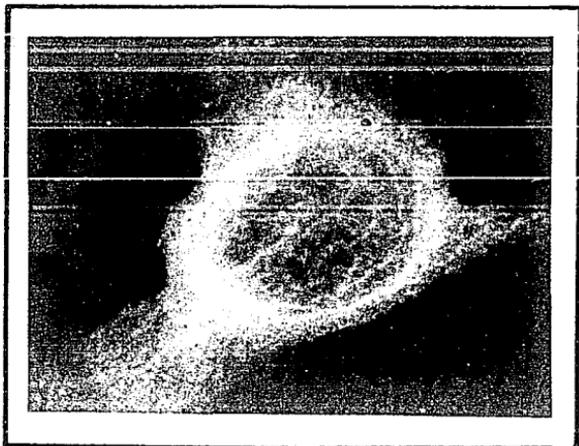


Figura Id

de IFI y fueron las más altas absorbancias en ELISA como se puede ver en la Tabla No. 3.

ANALISIS ELECTROFORETICO UNIDIMENSIONAL

Para los experimentos de inmuno-electrotransferencia (reconocimiento por anticuerpos de antígenos transferidos a papel de nitrocelulosa), se transfirieron a papel de nitrocelulosa las proteínas de citoesqueletos-tritón de células HEp-2 y se trataron con los sueros de los pacientes. Los resultados se muestran en la Figura II.

Los pacientes 1 a 5 tiñeron un patrón de bandas de proteínas en un rango de 40 a 68 kilodaltones (Kd), mismo que corresponde a la tinción con un anticuerpo monoclonal que reconoce las 5 clases de Filamentos Intermedios (39).

El suero del "paciente 6" solo reconoció una proteína con un peso molecular de aproximadamente 63 Kd. Algunas citoqueratinas pueden ser fácilmente confundidas con la vimentina y sus productos de degradación cuando se analizan en geles de poli-acrilamida en una dimensión. Por lo que nos vimos en la necesidad de hacer un análisis más profundo por medio de electroforesis bidimensional. Esta técnica nos permite una separación de las proteínas por punto isoeléctrico y peso molecular.

ANALISIS ELECTROFORETICO BIDIMENSIONAL

Para determinar precisamente que polipéptidos fueron reconocidos por el anticuerpo, la inmunotransferencia fue realizada con

TABLA No. 3

ANALISIS DE 6 SUEROS DE PACIENTES CON LES POR
IFI Y ELISA

Pacientes	Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)		ELISA A(492 nm)
	FI [*]	N	
1	1:256	-	1.05
2	1:256	+	0.97
3	1:256	+	1.73
4	1:256	-	1.13
5	1:256	-	0.95
6	1:256	-	2.0

*FI= Filamentos Intermedios

N= Núcleo

En el Apéndice II se encuentran las Historias
clínicas de los 6 pacientes que se estudiaron
más profundamente.

Figura II. Inmunolectrotransferencia* de citoesqueletos tritón de células HEP-2. Las tiras de nitrocelulosa 1 al 6 corresponden a los pacientes No. 1 al No. 6. A) teñido con tinta china, B) control negativo (suero de un paciente normal), C) anticuerpo monoclonal anti-vimentina PM= 58 kd proporcionado por J.F. Goetschy y D) anticuerpo monoclonal que reconoce los 5 tipos de Filamentos Intermedios.

* Cuando hablamos de inmunolectrotransferencia nos referimos a proteínas transferidas electroforéticamente de un gel de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa, detectados con un conjugado de inmunoglobulinas con peroxidasa.

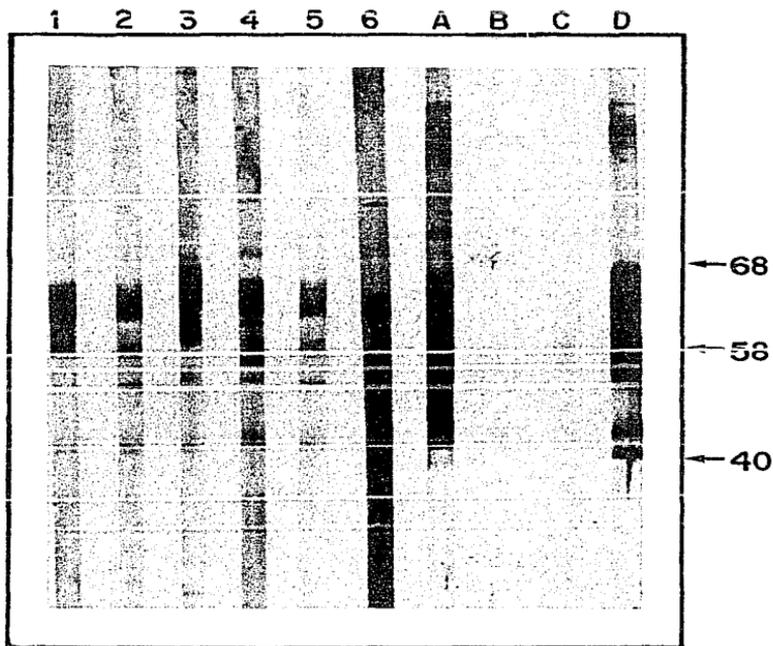


Figura II

citoesqueletos-tritón de las células HEp-2 separadas por un gel de electroforesis en dos dimensiones.

La nomenclatura que se utilizó para catalogar las proteínas analizadas en electroforesis bidimensional fue la propuesta por Roland Moll (40). Esta nomenclatura esta referida a citoqueratinas de algunas células epiteliales humanas y carcinomas. El catálogo se realizó con base al peso molecular y punto isoeléctrico, de tal manera que las citoqueratinas tienen numeración progresiva, de mayor a menor peso y de mayor a menor pH. En la Figura III se muestra de manera esquemática la migración electroforética de las citoqueratinas.

A continuación en la Figura IV vemos un gel de isoelectroenfoque teñido con azul de Coomassie en el que se puede observar un patrón de proteínas de citoesqueletos-tritón de células HEp-2. En la Figura V se puede ver un patrón de proteínas de citoesqueleto-tritón de células HEp-2 teñido con un anticuerpo monoclonal que reconoce los 5 tipos de filamentos intermedios (39), además en la misma figura se hacen notar algunas citoqueratinas y la vimentina.

El análisis de los sueros de pacientes 1 al 5 reveló que existe una tinción de citoqueratinas principalmente en un rango de pH de 4-6 en donde esta incluida de Vimentina y un rango de peso molecular 45-60 Kd que lo podemos observar en la Figura VI, es de hacer notar que la Citoqueratina "18" se encuentra especialmente intensa (41).

En el análisis del suero del paciente 6 Figura VII se observa

Figura III. Esquema de Roland Moll (40) para definir la migración electroforética de las Citoqueratinas de células epiteliales y carcinomas humanos.

PGK: 3-fosfoglicerocinasa

BSA: Albúmina sérica bovina

A: α -Actina de conejo

V: Vimentina humana

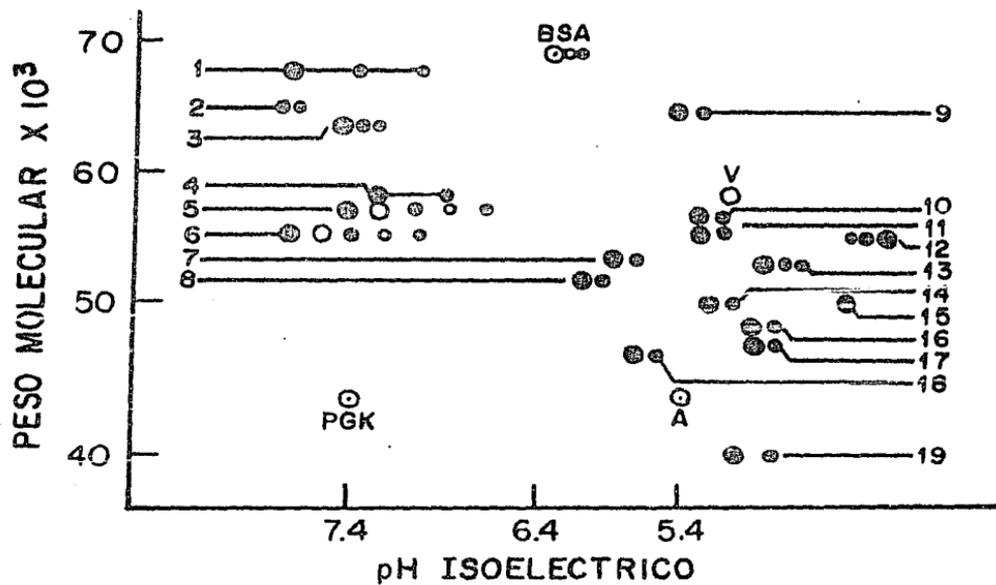


Figura III

Figura IV. Gel de electroforesis bidimensional teñido con azul de Coomassie en el cual se puede observar un patrón de proteínas de citoesqueletos-tritón de células HEp-2.

Figura V. Inmunoelectrotransferencia de un gel de electroforesis bidimensional teñido con anticuerpo monoclonal que reconoce los 5 tipos de Filamentos Intermedios.

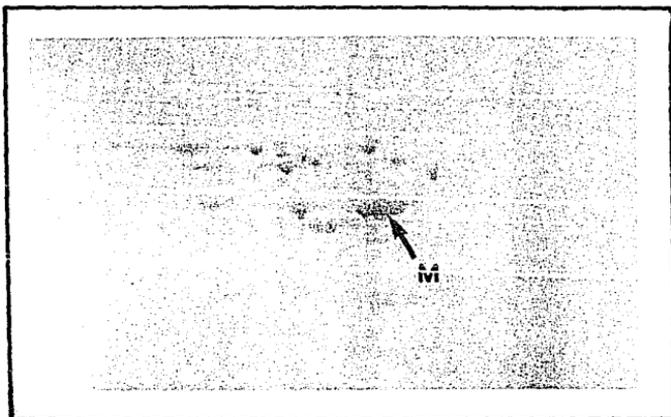


Figura IV

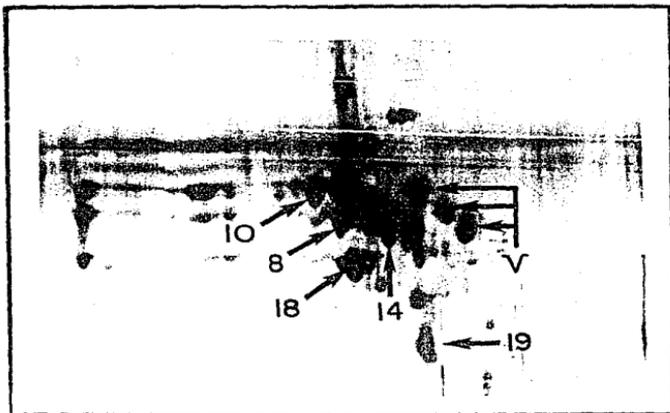


Figura V

que se tifieron las Citoqueratinas 8, 10, 14, 18 y no hay tinción de Vimentina. Nótese que los polipéptidos "8" y "14" se encuentran más intensos. Tanto en la Figura IV, VI como en la Figura VII existe una proteína que catalogamos como M que fue reconocida por el suero de los pacientes que aparentemente no pertenece a los Filamentos Intermedios, ya que el anticuerpo monoclonal que reconoce los 5 tipos de Filamentos Intermedios no la tiñe (Figura V) y dentro del catálogo de citoqueratinas humanas realizado por Roland Moll (40), no se describe (Figura III).

Figura VI. Inmunolectrotransferencia de un gel de electroforesis bidimensional teñido con el suero del paciente No. 1, los polipéptidos que se reconocieron por los sueros de los pacientes del No. 1 al No. 5 fueron muy similares.

Figura VII. Inmunolectrotransferencia de un gel de electroforesis bidimensional teñido con el suero del paciente No. 6, el cual presentaba alteraciones cutáneas.

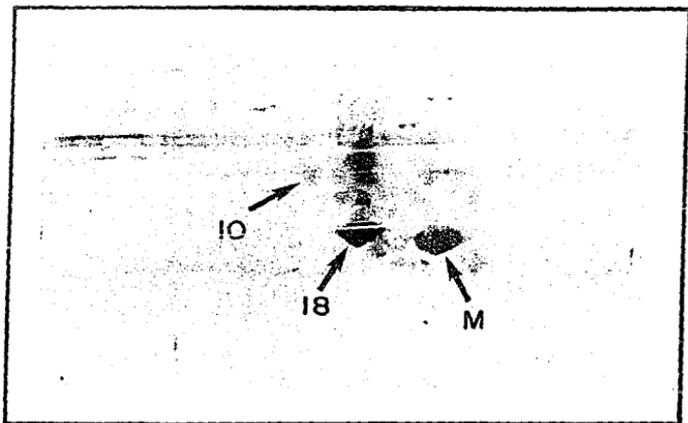


Figura VI

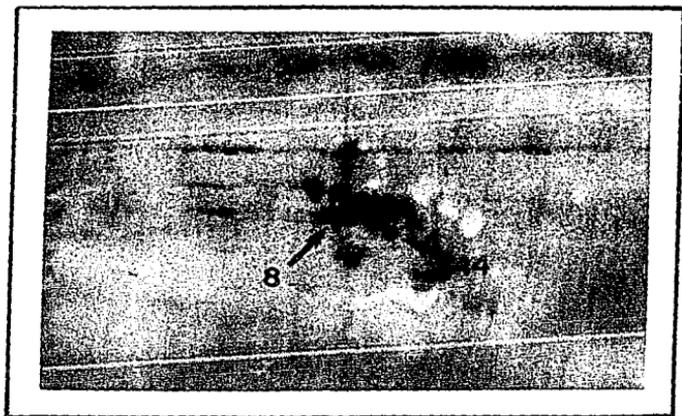


Figura VII

DISCUSION

En nuestro medio y particularmente en la población restringida de enfermos del Centro Médico "La Raza", durante aproximadamente dos años se lograron obtener 1000 sueros de diferentes enfermedades autoinmunes y como se vió en la Tabla No. 1 la mayoría de los sueros fueron de LES y AR (829 sueros). La incidencia de las otras enfermedades autoinmunes resulta ser en general muy baja como para ser considerado un estudio representativo, el cual si se quiere realizar llevaría mucho más tiempo para solamente la colección de sueros. Aún cuando se tuvieron bastantes sueros de AR estos presentaron un porcentaje bajo de anticuerpos contra el citoesqueleto. Nuestro estudio entonces se dirigió a la población de sueros con LES que presentaron el 25% de anticuerpos contra el citoesqueleto.

En México no existía un estudio actual de enfermedades autoinmunes y mucho menos en relación con el citoesqueleto. En la literatura se encuentra reportado, en diferentes enfermedades autoinmunes, la presencia de anticuerpos contra los tres tipos de filamentos del citoesqueleto (21). En relación a esto se habían encontrado anticuerpos contra Vimentina en la mayoría de artículos de estudios de LES y en éstos, las células que se utilizaron fueron una línea de células de fibroblastos de piel de humano. En un análisis de estas mismas células se encontró que efectivamente solo se encuentran filamentos de vimentina, y no de citoqueratinas

por lo que no se puede excluir que en LES no se generan anticuerpos contra citoqueratinas. En este estudio se utilizó la línea celular HEp-2 (línea celular de carcinoma de laringe humano) la cual, como se puede observar en la Figura IV, presenta un gel teñido con azul de Coomassie en el cual se encuentran las citoqueratinas y la vimentina. El hallazgo de que las células HEp-2 están compuestas de filamentos intermedios de vimentina y citoqueratinas ya había sido reportado por Senecal (26).

En un estudio de estandarización de la tinción en IFI encontramos que resulta determinante la manera de fijar y el tipo de fijador ya que como se conoce puede haber modificación de los determinantes antigénicos o puede modificarse considerablemente la morfología celular. Las condiciones que resultaron óptimas fueron con acetona pre-enfriada a -20°C durante 10 minutos (ver Métodos).

Ahora bien, en estudios previos algunos autores reportaron la presencia de IgG e IgM en los sueros de pacientes con LES (25) y en este caso mediante estudios de IFI con conjugados monovalentes encontramos que la mayoría son IgM (98%), este dato coincide con lo reportado con Senecal (94.8%) (26) y Kurki (90%) (24). Kurki en 1983 sugiere que esto puede ser resultado de una falta de regulación en el switch o cambio que sucede normalmente en una respuesta inmune para sintetizar IgG en lugar de IgM.

Inicialmente fue difícil catalogar los sueros que contenían anticuerpos contra el citoesqueleto ya que para poder hacerlo hay que conocer el tipo de distribución y localización así como cambios en las estructuras citoesqueléticas cuando las células se

tratan con drogas.

Por influencia de la literatura (36, 37, 38 y por observaciones de IFI se descartó la posibilidad de la existencia de anticuerpos contra microfilamentos en los sueros de LES ya que no se observó la presencia de fibras de tensión (42), al menos en los sueros que se analizaron. Lo que no se podía descartar a simple vista fue la presencia de microtúbulos o de filamentos intermedios.

Por lo que se recurrió a la utilización de colchicina ya que se sabe que inhibe la polimerización de tubulina y destruye los microtúbulos y en el caso de los filamentos intermedios, provoca una orientación en los filamentos de vimentina hacia la zona perinuclear que es conocido como "rearrreglo de los Filamentos Intermedios" (36, 37, 38, 42, 43). Sin embargo existe controversia entre los reportes acerca de la reorganización de las citoqueratinas ya que son varios los que afirman que no sufren ninguna modificación con el tratamiento de colchicina (43, 44, 45, 46).

Previa al análisis de los sueros, en células tratadas con colchicina, se realizaron algunos experimentos con las células HEp-2. Se encontró que, para observar rearrreglo de los Filamentos Intermedios en forma clara, la concentración de colchicina debe ser 5 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 horas, mediante este tratamiento de las células fue como se catalogaron los sueros de los pacientes y se encontró que los anticuerpos de los pacientes con LES son dirigidos contra Filamentos Intermedios. Este resultado confirmó lo reportado anteriormente por Alcover et al (21, 23, 26).

Se hace notar que una de las cosas que debe ser tomada en cuenta para evitar falsos positivos o falsos negativos en cuanto a la presencia de citoqueratinas y de vimentina en células HEp-2, es el estado de crecimiento de éstas en los cubreobjetos y en las cajas de petri, ya que si se encuentran en semiconfluencia se sintetizan bajos niveles de citoqueratinas y altos niveles de vimentina. Para evitar esto hay que utilizar siempre la misma fase de crecimiento (a final de la fase logarítmica o semiconfluencia). Esto fue reportado por Samuel D. Bernal et al (18).

Los resultados en ELISA también confirmaron que son Filamentos Intermedios ya que se utilizó como antígeno citoesqueletos-tritón tratados con alta concentración de sales, los cuales solo tienen Filamentos Intermedios (19).

Como se observó en la Figura II el análisis por Inmunotransferencia de la Electroforesis Unidimensional de proteínas de citoesqueletos-tritón de células HEp-2, revela la presencia de bandas de polipéptidos de un rango de 40-68 kd en los sueros de LES, pero no se podía mediante esta metodología asegurar con precisión de qué proteínas se trataba. Estos mismos resultados habían limitado también a los estudios anteriores (22, 23, 24, 26, 27). Sin embargo se hizo un análisis más cuidadoso de las proteínas ya que se enfocaron en su punto isoeléctrico y después se analizaron a través de un gel analítico de poliacrilamida. Los resultados fueron mostrados en la Figura IV y V.

Estos resultados entran en controversia con lo reportado por varios autores (22, 23, 24, 26, 27) ya que afirman haber encontrado

solo Vimentina en sus estudios. Se encontraron en 5 pacientes con lupus eritematoso sistémico resultados muy similares, donde se reconocieron tanto citoqueratinas y vimentina. Un hallazgo interesante fue el reconocimiento de solo citoqueratinas por un paciente el No. 6 de lupus eritematoso con manifestaciones cutáneas.

Se hace notar que en este estudio; aún cuando se modificó la proteína, no se modificó el epitope que reconocieron los anticuerpos de los sueros de los pacientes ya que se tuvieron resultados positivos con IFI, ELISA e Inmunolectrotransferencia en una y dos dimensiones respectivamente. Respecto de los probables mecanismos involucrados en la producción de autoanticuerpos contra los Filamentos Intermedios existen varias hipótesis.

Por un lado, los anticuerpos pueden elevarse como una "reacción normal" a la destrucción de tejido, pero también es posible que la tolerancia contra sí mismo se rompa por una reacción cruzada con antígenos microbianos (21, 47, 48). Otra teoría es que se forman "anticuerpos dañinos" que causan inflamación cuando forman complejos inmunes locales o circulantes. Este efecto, sin embargo, puede ser más complicado ya que hay factores intracelulares circulantes en los que se incluyen enzimas y otras proteínas que regulan la polimerización, despolimerización y degradación de las estructuras citoesqueléticas.

También se conoce que los Filamentos Intermedios son capaces de unir C1q (un componente del sistema de Complemento). La interferencia de los autoanticuerpos en estos procesos pueden conducir a un desajuste en el sistema de regulación. Este desajuste puede

tener consecuencias patológicas tales como el acúmulo de filamentos.

En el caso de la unión de C1q a Filamentos Intermedios que es una respuesta de autoanticuerpos independiente del reconocimiento del anticuerpo, la activación de C1q parece ser fisiológicamente importante y ha demostrado que opera también contra lipopolisacáridos bacterianos, células infectadas con virus y células infectadas con parásitos (49).

Por último, el estímulo de la producción de anticuerpos contra Vimentina y Citoqueratina puede ser derivado de la destrucción de células que contienen Filamentos de Vimentina como los linfocitos y las células del líquido sinovial, los hepatocitos y células epiteliales de la glándula exocrina en el caso de los Filamentos de Citoqueratínas.

Se hace notar, que este estudio dista mucho de ser un estudio generalizado de enfermedades autoinmunes. Sin embargo en lo que respecta a LES creemos que reúne varios hallazgos que son de consideración. No se está del todo satisfecho ya que existieron razones fuera de nuestro alcance como la recolección de muestras de suero así como de su mantenimiento antes de que fueran analizadas.

Para poder hacer una correlación adecuada de los hallazgos clínicos con los resultados de laboratorio, se sugiere un protocolo en el cual se delimiten mejor las condiciones de recolección de sueros en cuanto a la cantidad y calidad de estos así como, un estudio detallado de cada paciente con su evolución y sus manifes-

taciones clínicas (Historia Clínica completa). Además de ser posible determinar el "momento clínico" en el que se tomó la muestra de sangre y preferiblemente hacer varias tomas en diferentes etapas de la enfermedad.

Sería además interesante hacer un estudio de inmunoquímica aunado a microscopía electrónica y química de proteínas para determinar, si estos anticuerpos reconocen a los dos tipos de proteínas o de Filamentos o realmente se trata de una situación en la que existen determinantes antigénicos compartidos (16).

También sería interesante determinar si en este tipo de células HEP-2, en donde se encuentran la Vimentina y las Citoqueratinas comparten el mismo filamento y forman heteropolímeros o se encuentran de alguna manera formando copolímeros. Para estos últimos estudios se requeriría de anticuerpos monoclonales específicos y estudios de doble inmunofluorescencia (17).

CONCLUSIONES

1.- Se estandarizó el método de IFI en las células HEp-2 para la detección de AAN y anticuerpos contra el citoesqueleto en enfermedades autoinmunes, la fijación se realizó con acetona enfriada a -20°C durante 10 minutos a 4°C .

2.- Se estandarizó el método y la concentración adecuada de colchicina para provocar el rearrreglo de los Filamentos Intermedios a la zona perinuclear. Estas condiciones son $5\ \mu\text{g/ml}$ durante 2 horas a 37°C .

3.- Se encontraron las condiciones adecuadas para hacer determinación de ELISA, cuando se utilizó como antígeno citoesqueletos-tritón, para una caja 20 mls de Bi-car y $400\ \mu\text{g}$ de proteína de citoesqueletos-tritón.

4.- Se encontró que 1 de cada 4 pacientes con LES presentaron anticuerpos contra Filamentos Intermedios. En total un 25% de los pacientes de LES presentaron anticuerpos contra Filamentos Intermedios, para las otras enfermedades autoinmunes el porcentaje de estos anticuerpos fue: AR 4.3%, ARJ 6.3%, ESP 3.8%, Raynaud 5%, AHA 16.6%.

El 98% de los sueros de pacientes con LES reconocieron Filamentos Intermedios con la inmunoglobulina IgM y el otro 2% con IgG.

5. Se encontró que los anticuerpos de sueros de pacientes con LES, reconocen un rango de proteínas de 40-68 Kd de peso molecular cuando fueron analizadas por PAGE.

6. Se determinó que tanto las Citoqueratinas como la Vimentina son reconocidas por los sueros de pacientes con LES. Estas proteínas se encuentran principalmente en un rango de peso molecular de 45-60 Kd y en un rango de pH de 4-6 cuando se analizan por Electroforesis Bidimensional (Isoelectroenfoque y PAGE).

APENDICE I

LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES) (50, 51, 52)

Bases para el diagnóstico

- Ocurre primordialmente en las mujeres (20-40 años)
- Erupción sobre zonas expuestas a la luz solar
- Síntomas articulares en 90% de los enfermos
- Afección de múltiples sistemas
- Depresión de los niveles de hemoglobina, de los leucocitos y de plaquetas.
- Datos serológicos: prueba de anticuerpo antinuclear positiva y anticuerpos contra DNA.

Consideraciones generales

El lupus eritematoso Sistémico es un trastorno inflamatorio autoinmunitario que puede afectar a múltiples órganos y sistemas. Sus manifestaciones sintomáticas se piensa que son secundarias y sean debidas al atrapamiento de los complejos antígeno-anticuerpo en los capilares de las estructuras viscerales. El curso clínico puede variar desde un trastorno con episodios leves hasta una enfermedad rápidamente fulminante y mortal.

El lupus eritematoso Sistémico no es raro. Las cifras recientes de una gran población urbana representativa indican una

frecuencia que excede un enfermo por cada 2,000 personas. Aproximadamente 85% de los enfermos son mujeres. Aunque el padecimiento puede ocurrir a cualquier edad, la mayoría de los enfermos se encuentran comprendidos entre la edad de 10-50 años, con gran agrupamiento entre la edad de 20 y 40 años.

Antes de hacer un diagnóstico de lupus eritematoso sistémico espontáneo, es imperativo el evaluar que el trastorno no haya sido inducido por algún medicamento. Aproximadamente 25 medicamentos han sido implicados en la producción del síndrome semejante al lupus, pero sólo algunos cuantos causan el trastorno con frecuencia apreciable. La procainamida (anti-arritmico) y la hidralazina (anti-hipertensivo) constituyen los más importantes y mejor estudiados de estos medicamentos. Aunque las pruebas de anticuerpos antinucleares y otros hallazgos séricos se vuelven positivas en muchas personas que están recibiendo estas substancias, sólo algunas cuantas tienen manifestaciones sintomáticas.

Cuatro características distinguen al lupus inducido por medicamentos del lupus de aparición espontánea: (a) en el síndrome inducido por medicamentos, el cociente de los sexos es casi el mismo; (b) la nefritis y las características del sistema nervioso central ordinariamente no están presentes; (c) el complemento deprimido del suero y los anticuerpos contra el DNA nativo están ausentes, y (d) las características clínicas y las anomalías de los análisis de laboratorio revierten hacia lo normal, cuando el medicamento ofensor es suspendido, aunque las anormalidades séricas pueden persistir durante meses o años.

La ocurrencia familiar del lupus eritematoso sistémico se ha documentado iterativamente y el trastorno ha afectado en numerosos casos de gemelos univitelinos. La confluencia de características séricas (prueba con respuesta positiva para los anticuerpos contra el DNA, hipergammaglobulinemia) es observada en los miembros de las familias asintomáticas y la frecuencia de otras enfermedades reumáticas está aumentada entre los familiares de los enfermos. Una hipótesis actual sugiere que hay una anomalía subyacente genéticamente determinada en la regulación inmunitaria, relacionada con la función defectuosa de las células T, resultando en hiperactividad de las células B. Esto conduce a la producción de autoanticuerpos múltiples que causan daño tisular a través del mecanismo del depósito de complejos inmunitarios.

Se piensa que los virus desempeñen algún papel en la inducción de este trastorno en algún huésped genéticamente dispuesto. El patón de Nueva Zelanda en el cual se desarrolla un síndrome que es notoriamente semejante al lupus idiopático del humano, almacena al virus de la leucemia murina. Los enfermos con lupus diseminado tienen cifras elevadas de anticuerpos contra diversos antígenos virales, incluyendo los del sarampión, rubéola y parinfluenzavirus. En los estudios de los enfermos con este trastorno, las micrografías electrónicas de las células endoteliales de los capilares en el tejido de la biopsia renal y de los linfocitos circulantes, han mostrado estructuras reticulares tubulares que se piensa que estén relacionadas con los virus.

El diagnóstico de lupus eritematoso sistémico debe sospecharse

en los enfermos que tienen una enfermedad que afecta a múltiples sistemas con positividad en el suero (por ejemplo, anticuerpos antinucleares, pruebas serológicas para la sífilis).

La American Rheumatism Association ha propuesto que el diagnóstico de lupus eritematoso Sistémico puede hacerse con razonable probabilidad si se satisfacen cuatro de los siguientes 11 criterios, en serie o en forma simultánea, durante un intervalo de observación: exantema malar; exantema discoide; fotosensibilidad, úlceras bucales; artritis no erosiva; serositis; trastorno renal; trastorno neurológico; anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia o trombocitopenia; preparación de célula LE positiva, anti-DNA, anti-Sm o prueba serológica falsa positiva para la sífilis; anti-cuerpo antinuclear positivo.

Datos Clínicos

A. Síntomas y signos: Las características generales incluyen fiebre, anorexia, malestar y pérdida de peso. La mayoría de los enfermos tienen lesiones cutáneas en algún momento; la erupción característica en "alas de mariposa" afecta a menos de la mitad de los enfermos. Otras manifestaciones cutáneas incluyen lupus discoide, lesiones típicas en las puntas de los dedos, eritema periungular, infartos de los pliegues de las uñas y hemorragias como astillas. La alopecia se observa comúnmente. Las lesiones de las mucosas tienden a ocurrir durante los periodos de exacerbación.

Los síntomas articulares con o sin sinovitis activa, ocurren en más de 90% de los enfermos y constituyen a menudo la manifesta-

ción más temprana. La artritis rara vez es deformante; los cambios erosivos casi nunca son observados en las radiografías. Los nódulos subcutáneos son raros.

Las manifestaciones oculares incluyen conjuntivitis, fotofobia, ceguera transitoria y borramiento de la visión. Las manchas algodonosas sobre la retina (cuerpos citoides) representan la degeneración de las fibras nerviosas debida a oclusión de los vasos retinianos.

La pleuresía, derrame pleural, bronconeumonía y neumonitis son frecuentes. La enfermedad pulmonar restrictiva es demostrable a menudo.

El pericardio está afectado en la mayoría de los enfermos. La insuficiencia cardiaca puede resultar de la miocarditis y la hipertensión. Las arritmias cardiacas son comunes.

El dolor abdominal, íleo y peritonitis pueden resultar de vasculitis.

Las complicaciones neurológicas del lupus eritematoso Sistémico, por lo general, se observan en los enfermos que tienen enfermedad muy activa. Los cambios mentales, depresión grave y la psicosis son intensificadas en ocasiones por la administración de grandes dosis de glucocorticoides.

Se han observado diversas formas de nefropatía. La glomerulonefritis proliferativa que puede estar asociada con el síndrome nefrótico y la insuficiencia renal, constituye la amenaza mayor

contra la vida del enfermo de lupus eritematoso Sistémico. La nefritis focal o mesangial es habitualmente benigna pero ocasionalmente puede progresar. Un tercer tipo, la glomerulonefritis membranosa, está asociada con proteinuria profusa y el síndrome nefrótico tiende a progresar muy lentamente. Cuando se da tratamiento apropiado, es favorable la tasa de supervivencia aún en pacientes con enfermedad renal grave (glomerulonefritis proliferativa).

Otras características sintomáticas incluyen: linfadenopatía, esplenomegalia, anemia hemolítica y púrpura trombocitopénica.

B. Datos de Laboratorio: Los anticuerpos antinucleares pueden ser detectados en aproximadamente 95% de los enfermos. Las elevaciones séricas de anticuerpo contra DNA de doble tira y la disminución del complemento sérico -datos sugestivos de actividad de la enfermedad- suelen volver a la normalidad durante la remisión. La hipergammaglobulinemia, una prueba de Coombs con reacción positiva y el factor reumatoide pueden ser demostrables en el suero. Las pruebas serológicas positivas falsas para la sífilis ocurren en alrededor de 20% de los enfermos. La prueba de absorción de anticuerpos fluorescentes contra el treponema también puede resultar positiva falsa, un patrón en cuentas de rosario de la inmunofluorescencia puede servir para distinguir de una verdadera reacción positiva. Los títulos de anticuerpos contra una amplia gamma de otros tejidos celulares y de órganos pueden ser observados.

A menudo hay anemia leve normocítica, normocrómica y ocasionalmente anemia hemolítica autoinmunitaria. La velocidad de sedimenta-

ción eritrocitaria casi siempre se eleva cuando la enfermedad está activa. La leucopenia y la linfopenia son comunes; la trombocitopenia ocasionalmente puede ser grave, provocando púrpura.

Las pruebas de la función hepática a menudo tienen leves anomalías. La anomalía del sedimento urinario se halla casi siempre en asociación con las lesiones renales. Muestras de eritrocitos y de proteinuria leve son frecuentes durante la exacerbación de la enfermedad; estas muestras, por lo general, se abaten con la mejoría. La proteinuria profusa indica una grave afección.

Tratamiento

El tratamiento va a depender de la sintomatología que presente el paciente.

En la mayoría de los casos se administra glucocorticoides. Pero en el caso de que los enfermos sean resistentes a los glucocorticoides se les administra agentes inmunosupresores como la ciclofosfamida, clorambucil o azatioprina.

Curso y pronóstico

En la mayoría de los pacientes la enfermedad sigue un curso crónico leve, ocasionalmente interrumpido por la actividad de la enfermedad. Con el tiempo, el número y la intensidad de las exacerbaciones disminuye y la probabilidad de mayores ataques a las estructuras viscerales declina. Después de 5 años de enfermedad los datos anormales de laboratorio, como la velocidad de sedimentación eritrocitaria aumentada y títulos anti-DNA se vuelven normales en

muchos enfermos. Sin embargo, hay algunos en los cuales la enfermedad adquiere una forma virulenta que conduce a alteración grave de las estructuras vitales, como el pulmón, corazón, encéfalo o riñones, y la enfermedad puede conducir a la muerte. Aunque tales manifestaciones ocurren con mayor probabilidad en las fases iniciales de la enfermedad, se debe estar alerta a la posibilidad de su ocurrencia a cualquier tiempo. La complicación grave más frecuentemente observada es la enfermedad renal progresiva, seguida por la afección del sistema nervioso central. Otra causa importante de enfermedad y muerte es la infección, relacionada en parte al uso de los glucocorticoides (50, 51, 52).

APENDICE II

Datos de las Historias clínicas de los 6 pacientes de LES que se estudiaron más profundamente.

Paciente No. 1

Sexo: Femenino

Edad: 20 años

Diagnóstico: Lupus Eritematoso Sistémico, Hipertensión arterial sistémica

Evolución: Inició a los 13 años de edad

Datos Clínicos: Artritis, vasculitis, alteraciones dérmicas, eritema facial en heliotropo

Dos biopsias: 1. Glomerulonefritis renales
2. Glomerulonefritis proliferativa difusa

Datos de laboratorio:

<u>En suero</u>		<u>Valores Normales</u>
CH ₅₀	- 125 mg%	95 - 150 mg%
C ₃	- 57 mg%	46 - 114 mg%
C ₄	- 12 mg%	9 - 35 mg%
Hb	- 12.9 g/dl	12 - 16 g/dl
Hematocrito	- 37.6%	38 - 47%
Plaquetas	- 368,000/mm ³	150,000 - 400,000/mm ³
Leucocitos	- 5,300/mm ³	4,500 - 11,000/mm ³
AAN	- 256F	AAN - neg

Paciente No. 2. No se encontró su Historia Clínica

Paciente No. 3

Sexo: Femenino

Edad: 60 años

Diagnóstico: Lupus Eritematoso Sistémico

Evolución: Inició en Enero 1982

Datos Clínicos: Artritis, Raynaud, eritema facial

Datos de laboratorio:

<u>En suero</u>		<u>Valores Normales</u>
CH ₅₀	- 100 mg%	95 - 150 mg%
C ₃	- 51 mg%	46 - 114 mg%
C ₄	- 14 mg%	9 - 35 mg%
Hb	- 14 g/dl	12 - 16 g/dl
Hematocrito	- 43.7%	38 - 47%
AAN	- 256 MF y F	AAN - neg

Paciente No. 4

Sexo: Femenino

Edad: 38 años

Diagnóstico: Lupus Eritematoso Sistémico

Evolución: Inicio en Febrero 1985

Datos Clínicos: Vasculitis y se le realizó una Esplenectomía (quitar el bazo)

Datos de laboratorio:

<u>En suero</u>		<u>Valores Normales</u>
CH ₅₀	- 120 mg%	95 - 150 mg%
C ₃	- 73 mg%	46 - 114 mg%
C ₄	- 23 mg%	9 - 35 mg%
Hb	- 14.8 g/dl	12 - 16 g/dl
Hematocrito	- 45%	38 - 47%
Plaquetas	- 230,000/mm ³	150,000 - 400,000/mm ³
Leucocitos	- 6,100/mm ³	4,500 - 11,000/mm ³
AAN	- 256F	AAN - neg
VDRL	- (-)	

Paciente No. 5

Sexo: Femenino

Edad: 34 años

Diagnóstico: Lupus Eritematoso Sistémico

Evolución: Inició en Septiembre de 1984

Datos Clínicos: Artritis, probable Trombosis cerebral

Datos de laboratorio:

<u>En suero</u>		<u>Valores Normales</u>
Hb	- 13 g/dl	12 - 16 g/dl
Hematocrito	- 38.5%	38 - 47%
VDRL	- (+)	VDRL - (-)
AAN	- 256F	AAN - (-)

Ac. Fluorescentes para
Treponema - (-)

Paciente No. 6

Sexo: Femenino

Edad: 55 años

Diagnóstico: Lupus Discoide Diseminado

Antecedentes

heredo-famili-
liares:

Diabetes mellitus a los 10 años

Evolución: Inició en Septiembre 1980

Datos Clínicos: Mancha pruriginosa eritematosa, úlceras orales,
caída de pelo, dermatosis, vasculitis en manos y en
la planta del pié

Datos de laboratorio:

<u>En suero</u>		<u>Valores Normales</u>
CH ₅₀	- 31 mg%	95 - 150 mg%
C ₃	- 71 mg%	46 - 114 mg%
C ₄	- 6 mg%	9 - 35 mg%
Hb	- 15.9 g/dl	12 - 16 g/dl
Hematocri- to	- 48%	38 - 47%
AAN	- 256F	AAN - (-)

TABLA No. 4

PORCENTAJE DE HOMBRES Y MUJERES QUE PRESENTARON LES Y FUERON
POSITIVOS CONTRA FILAMENTOS INTERMEDIOS

Sexo	No. de Pacientes		Controles *	Edad (Años)
	600 LES	150 LES (+) FI**		
Hombres	150 (25%)	12 (8%)	10	35-50 años
Mujeres	450 (75%)	138 (92%)	10	20-60 años

* Controles edad 20-40 años

** Que reconocieron Filamentos Intermedios

BIBLIOGRAFIA

1. Zanetti, M. (1986) Idiotypic regulation of autoantibody production. CRC Critical Reviews in Immunology 6: 151-183.
2. Fields, T.R., Zarrabi, M.H., Gerardi, E.N., Bennett, R.S. (1986) Reticuloendothelial system Fc receptor function in the drug induced Lupus Erythematosus Syndrome. J. Rheumatology 13: 726-731.
3. Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D.K. (1985) Immunology. The C.V. Mosby Company.
4. Chaiamnuay, P., Johnston, C., Maier, J. y Russell, A.S. (1984) Technique-related variation in results of FANA tests. Annals of the Rheumatic Diseases 43: 755-757.
5. Matter, L., Schopfer, J.A., De Robertis, E.M. (1982) Molecular characterization of ribonucleoprotein antigens bound by antinuclear antibodies. Arthritis and Rheumatism 25: 1278-1283.
6. Taylor, D.L. y Condeelis, J.S. (1979) Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. International Review of Cytology 56: 57-144.
7. De Robertis, E.D.F. y De Robertis, E.M.F. (1980) The cytosol and cytoskeleton. Cell and Molecular Biology, Saunder HRW.

- 179-183 .
8. Weber, K. y Osborn, M. (1980) Moléculas de la matriz celular. American Scientist. 243: 76-88.
 9. Snyder, J.A. y Mc Intosh, J.R. (1976) Biochemistry and Physiology of microtubules. Ann. Rev. Biochem. 45: 669-720.
 10. Huxley, H.E. (1969) Mechanism of muscular contraction. Science 16A: 1356-1366.
 11. Goldman, R., Pollard, T. y Rosenbaum, J.E. (1976) Cell motility. Vols. A al C Cold Spring Harbor Laboratory.
 12. Korn, E.D. (1978) Biochemistry of actomyosin dependent cell motility (A Review). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 588-599.
 13. Mooseker, M.S. y Tilney, L.G. (1975) Organization of an actin Filament-membrane complex (filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells). J. Cell Biol. 57: 725-743.
 14. Soranno, T. y Bell, E. (1982) Cytostructural dynamics of spreading and translocating cells. J. Cell Biol. 95: 127-136.
 15. Korn, E.D. (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. Physiological Reviews 52: 672-737.
 16. Pruss, R.M., Mirsky, R. y Raff, M.C. (1981) All classes of

Intermediate Filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* 27: 419-428.

17. Quinlan, R.A. y Franke, W.W. (1982) Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by chemical crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3452-3456.
18. Bernal, S.D., Stahel, R.A. (1985) Cytoskeleton-associated proteins: their role as cellular integrators in the neoplastic process. *CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology* 3: 191-204.
19. Gown, A.M. y Vogel, A. (1982) Monoclonal antibodies to Intermediate Filament proteins of human cells: Unique and cross-reacting antibodies. *J. Cell Biol.* 95: 414-424.
20. Knapp, L.W., O'guin, W.M. y Sawyer, R.H. (1983) Rearrangement of the keratin cytoskeleton after combined treatment with microtubule and microfilament inhibitors. *J. Cell Biol.* 97: 1788-1794.
21. Kurki, P. y Virtanen, I. (1984) The detection of Human antibodies against cytoskeletal components. (A Review). *J. Immunological Methods* 67: 209-223.
22. Alcover, A., Hernández, C. y Avila, J. (1985) Human Vimentin autoantibodies preferentially interact with a peptide of 30 KD mol. wt, located close to the amino-terminal of the molecule. *Clin. Exp. Immunol.* 61: 24-30.

23. Alcover, A., Molano, J., Renart, J. y Avila, J. (1984) Antibodies to vimentin intermediate filaments in sera from patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism 27: 922-928.
24. Kurki, P., Helve, T. y Virtanen, I. (1983) Antibodies to cytoplasmic Intermediate Filaments in rheumatic diseases. J. Rheumatology 10: 558-562.
25. Alcover, A., Ramirez-Lafita, F., Hernández, C., Nieto, A. y Avila, J. (1985) Antibodies to Vimentin Intermediate Filaments in sera from patients with SLE an RA: Quantitation by solid phase radioimmunoassay. J. Rheumatology 12: 233-236.
26. Senecal, J.L., Rothfield, N.F. y Oliver, J.M. (1982) Immunoglobulin M autoantibody to Vimentin Intermediate Filaments. J. Clin. Invest. 69: 716-721.
27. Senecal, J.L., Oliver, J.M. y Rothfield, N. (1985) Anticytoskeletal autoantibodies in the connective tissue diseases. Arthritis and Rheumatism 28: 889-898.
28. Wick, G., Baudner, S. y Herzog, F. (1980) Immunofluorescence (Contributions to the theory and practice of Immunofluorescence). Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn.
29. Garrels, J.I. y Gibson, W. (1976) Identification and characterization of multiple forms of actin. Cell 9: 793-805.
30. Bradford, Marion M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry
72: 248-254.

31. Voller, A., Bidwell, D.E. y Bartlett, A. (1979) The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dinattech Laboratories, Inc.
32. Laemmli, V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
33. O'Farrell, P.H. (1975) High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.
34. Cleveland, W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. y Laemmli, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252: 1102-1106.
35. Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
36. Blose, S.H. y Chacko, S. (1976) Rings of intermediate (100 Å) filament bundles in the perinuclear region of vascular endothelial cells. J. Cell Biol. 70: 459-466.
37. Goldman, R.D. (1971) The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. J. Cell Biol. 51: 752-762.
38. Starger, J.M., Brown, W.E., Goldman, A.E. y Goldman, R.D. (1978) Biochemical and immunological analysis of rapidly purified 10-nm filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. J. Cell Biol. 78: 93-108.

39. Pruss, R.M. (1985) Efficient detection of Intermediate Filament proteins using a panspecific monoclonal antibody: Anti-IFA. *J. Neuroimmunology* 8: 293-299.
40. Moll, R., Franke, W.W. y Schiller, D.L. (1982) The catalog of Human Cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24.
41. Ochs, D.C., Mc Conkey, E.H. y Guard, N.L. (1981) Vimentin-derived proteins. *Exp. Cell Res.* 135: 355-362.
42. Weber, K. y Osborn, M. (1982) Cytoskeleton: Definition, structure and gene regulation. *Path. Res. Pract.* 175: 129-144.
43. Lazarides, E. (1982) Intermediate Filaments: A Chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 219-250.
44. Sun, T.T. y Green, H. (1978) Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells. *Cell* 14: 469-476.
45. Whitman, M., Steinert, P.M. y Goldman, R.D. (1984) Human epithelial cell Intermediate Filaments: isolation, purification, and characterization. *J. Cell Biol.* 98: 1407-1421.
46. Franke, W.W., Schmid, E., Weber, K. y Osborn, M. (1979) HeLa cells contain intermediate-sized filaments of the prekeratin type. *Exp. Cell Res.* 118: 95-109.
47. Fujinami, R.S., Oldstone, M.B., Wroblewska, Z. y Koprowski, H. (1983) Molecular mimicry in virus infection: Crossreaction

of measles virus phosphoprotein or of herpes simple virus protein with human intermediate filaments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2346-2350.

48. Viac, J., Paire, J., Desgranges, C. y Thivolet, J. (1986) Epstein-Barr virus transformed lymphocytes from patients with Bullous diseases produce autoantibodies to Cytokeratins. Clinical Immunology and Immunopathology 39: 277-284.
49. Linder, E., Lehto, V.P. y Stenman, S. (1979) Activation of complement by cytoskeletal Intermediate Filaments. Nature 278: 176-177.
50. Krupp, M.A. y Chatton, M.J. (1986) Diagnóstico Clínico y tratamiento. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. Edición 21ª. Cap. No. 14: 504-530.
51. Koffler, D. (1980) Systemic Lupus Erythematosus. Scient. Améri. 243: 40-51.
52. Hardin, J.A. (1986) The Lupus autoantigens and the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism 29: 457-460.
53. Goetschy, J.F., Ulrich, G., Aunis, D. y Treška, J.C. (1986) The organization and solubility properties of Intermediate Filaments and microtubules of cortical astrocytes in culture. J. Neurocytology 15: 000
54. Wang, E., Fischman, D., Liem, R.H. y Sun, T.T. (1985) "Intermediate Filaments". Annals of the New York Academy of Sciences.

Vol. 455.

Appleton's New Cuyás. Dictionary, fifth edition (1972), ed.
Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey.

Real Académic Española. Diccionario de la Lengua Española, vigésima edición (1984), ed. Espasa-Calpe, S.A. Madrid España.