

11261  
2ej  
8

*Universidad Nacional Autónoma  
de México*

## **FACULTAD DE MEDICINA**

**ANTICUERPOS A RIBONUCLEOPROTEINA RIBOSOMICA.  
CARACTERIZACION DEL ANTIGENO Y PREVALENCIA DEL  
ANTICUERPO EN ENFERMEDADES REUMATICAS.**

# **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)**

**P R E S E N T A :**

*Jose de Jesús Alfredo Cortés Hermosillo*

**MEXICO, D. F. 1989.**

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ABREVIATURAS

LES.	LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.
SSP.	SINDROME DE SJOGREN PRIMARIO.
ESP.	ESCLEROSIS SISTEMICA PROGRESIVA.
AR.	ARTRITIS REUMATOIDE.
EMTC.	ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONJUNTIVO.
PM/DM.	POLIMIOSITIS/DERMATOMIOSITIS.
ARA	AMERICAN RHEUMATISM ASSOCIATION.
AAN.	ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.
IFI.	INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.
IDD.	INMUNODIFUSION DOBLE.
CIE.	CONTRA INMUNOELECTROFORESIS.
IEF.	INMUNOELECTROFORESIS.
RNP.	RIBONUCLEOPROTEINA.
RNP-n o RNP-U1.	AUTOANTICUERPO DIRIGIDO A RNA DE SERIE U.
Ro/SSA.	AUTOANTICUERPO DIRIGIDO A RNA DE SERIE Y.
La/SSB.	AUTOANTICUERPO DIRIGIDO A RNA DE SERIE Y.
Sc1-70.	AUTOANTICUERPO DIRIGIDO A TOPOISOMERASA.
Jo-1.	AUTOANTICUERPO DIRIGIDO A HISTIDIL-RNA <sup>t</sup> SINTETASA.
Sm.	AUTOANTICUERPO DIRIGIDO A RNA DE SERIE U.
RNP-n.	AUTOANTICUERPO DIRIGIDO A PROTEINAS RIBOSOMICAS.
ETC.	EXTRACTO DE TIMO DE CONEJO.
EDH.	EXTRACTO DE BAZO HUMANO.
ER.	EXTRACTO RIBOSOMICO.

## RESUMEN

Las enfermedades reumáticas generalizadas en su conjunto y el LES en particular, se caracterizan por la presencia de muchos autoanticuerpos, los cuales están dirigidos contra macromoléculas celulares, nucleares y/o citoplásmicas, esta característica inmunológica no es inespecífica, sino que ciertos autoanticuerpos se detectan exclusivamente en algunos padecimientos, o al menos están estrechamente relacionados con estos. Esta tesis describe un anticuerpo particularmente presente en LES así como la caracterización del sustrato antigénico reactivo con ese anticuerpo. Utilizando técnicas de electroforesis de alto voltaje e inmunoelectrotransferencia, las cuales permiten análisis moleculares, se identificaron 2 epítopos ribonucleoproteicos ribosómicos, denominadas rA y rB. Aunque presente en el 12% de los casos con LES, el anti-RNP-r sólo se encontró en esta entidad, a excepción de un caso con SSP.

## SUMMARY

The presence of serum antibodies against nuclear, cytoplasm and citoeskeletal components of mammalian tissue is a common finding in systemic rheumatic diseases. Among antibodies which react with cytoplasmic structures, antiribosomal and antiribosomal ribonucleoprotein antibodies are relatively common in systemic lupus erythematosus.

The prevalence of antibodies to ribosomal ribonucleoproteins (r-RNP) was studied in patients with rheumatic diseases. Seven patients had precipitating antibodies against r-RNP, 6 had systemic lupus erythematosus, one had primary Sjögrens Syndrome. Anti-r-RNP was not present in mixed connective tissue disease, rheumatoid arthritis, progressive systemic sclerosis, CREST, primary Raynauds or normal control sera. A partial immunological identity precipitin line was present between (U1)r-RNP and r-RNP, but these were distinct in physicochemical properties. Western-blot analysis of ribosomal extract using anti-r-RNP IgG revealed 2 polypeptides called rA and rB which appear to be the important antigenic determinants.

## INDICE

SECCION	PAGINA
1. INTRODUCCION	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y METODOS	9
A. CARACTERIZACION DE AUTOANTICUERPOS	10
B. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DEL ANTIGENO	10
4. RESULTADOS	12
A. PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-RNF-r EN ENFERMEDADES REUMATICAS	12
B. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DEL ANTIGENO	13
C. SENSIBILIDAD A ENZIMAS	15
D. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA E INMUNOTRANSFERENCIA	17
5. DISCUSION	18
6. REFERENCIAS	23
7. ANEXO-METODOLOGIA EMPLEADA	26
I. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA	26
II. IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNODIFUSION DOBLE	27
III. OBTENCION DE EXTRACTO DE TIPO DE CONEJO	27
IV. OBTENCION DE EXTRACTO DE BAZO HUMANO	28
V. OBTENCION DE EXTRACTO RIBOSOMAL	28
VI. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	29
VII. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	30

## INTRODUCCION

Desde 1941 un grupo heterogeneo de enfermedades reumáticas se han agrupado bajo diversos nombres: enfermedades de la colágena, del tejido conjuntivo, colágeno vasculares y finalmente enfermedades reumáticas generalizadas, en estas enfermedades y en particular en el lupus eritematoso sistémico (LES), es común la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra macromoléculas nucleares, citoplásmicas y elementos del citoesqueleto, los cuales se agrupan bajo la denominación de anticuerpos antinucleares (AAN). La prueba más utilizada para detectar AAN es la de inmunofluorescencia indirecta (IFI), mediante la cual se pueden identificar diferentes patrones fluorescentes, de los cuales, el más común es el homogéneo que se encuentra cuando los anticuerpos están dirigidos contra nucleoproteínas. Este patrón se puede encontrar en el LES, síndrome de Sjögren primario (SSP), esclerosis sistémica progresiva (ESP), artritis reumatoide (AR) y enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC). El patrón periférico (anular o circular) se asocia a anticuerpos contra DNA y se encuentra principalmente en pacientes con LES. El patrón moteado sugiere la presencia de anticuerpos contra moléculas solubles extraíbles del núcleo y se detectan predominantemente en LES, ESP y EMTC. El patrón nucleolar es el menos frecuente y representa anticuerpos contra el RNA nuclear, que se encuentran en pacientes con fenómeno de Raynaud, LES y ESP. (1-6).

A pesar de que el método de inmunofluorescencia indirecta es una excelente prueba para detectar AAN existen otros métodos como los de precipitación en gel, inmunodifusión doble (IDD), contrainmunolectroforesis (CIE), inmunolectroforesis (IEF) y métodos inmunoenzimáticos (ELISA e Inmunotransferencia) que nos permiten definir la especificidad de estos autoanticuerpos. Los antígenos nucleares y/o citoplásmicos contra los que se dirigen los autoanticuerpos son particularmente proteínas no histonas (DNA o RNA pequeños) y en algunos otros sus determinantes antigénicos están constituidos por alanil, treonil o histidil RNAT-sintetasa, topoisomerasa o polimerasa y cada uno de estos autoanticuerpos ha sido asociado a algún padecimiento reumático generalizado en particular: así, los autoanticuerpos anti-DNA bicatenario (o nativo) se han asociado a LES. Los autoanticuerpos a RNA pequeños como el anti-Sm que identifica a las ribonucleoproteínas (RNP) de la serie U (1, 2, 4, 5 y 6) son detectados en un alto porcentaje de los pacientes con LES. Otro anticuerpo dirigido también a RNP es el denominado anti-RNP U1 o RNP-n, el cual cuando se encuentra a títulos altos ha sido asociado con síndromes de superposición, también conocidos como EMTC. En pacientes con SSP se han detectado dos tipos de autoanticuerpos asociados también a RNA pequeños y que han sido denominados Ro/SSA y La/SSB; sin embargo, estos autoanticuerpos no parecen ser exclusivos de este padecimiento ya que ambos han sido detectados en proporciones variables en varios padecimientos



reumáticos generalizados. Los anticuerpos a topoisomerasa como es el caso del anti-Scl-70 son detectados exclusivamente en pacientes con ESP y los dirigidos a alanil, treonil o histidil RNAt sintetasa como los autoanticuerpos anti-Jo-1 se encuentran en pacientes con polimiositis o dermatomiositis (PM/DM). (7-8).

Entre los anticuerpos específicos contra estructuras del citoplasma, los que reaccionan con ribosomas son relativamente comunes. Aproximadamente del 10 al 20% de los pacientes con LES cursan con anticuerpos contra ribosomas, a pesar de su frecuencia tan alta, a la fecha no existe una caracterización precisa de estos autoanticuerpos. (9-13).

En el protocolo de estudio de los pacientes con enfermedades reumáticas la determinación de AAN por IFI se realiza en forma cotidiana. En una paciente que reunía criterios para diagnosticarla como LES, se encontró un patrón de fluorescencia limitado al citoplasma. Al realizar la prueba de IDB contra extracto de timo de conejo (ETC), se identificó una banda de precipitación inmune que no mostró identidad inmunológica completa con sueros de referencia anti-Sm, Ro/SSA, La/SSB. Además mostró una identidad inmunológica parcial con un suero anti-RNP-n (U1). Por lo anterior decidimos realizar la identificación y caracterización del antígeno contra el cual se dirigen dichos autoanticuerpos, así como conocer la prevalencia del anticuerpo en pacientes con distintas enfermedades reumáticas.

## OBJETIVOS

-Definir la prevalencia de anticuerpos a ribonucleoproteína ribosómica (RNP-r) en sueros de enfermos con distintas enfermedades reumáticas y en un grupo de individuos sanos.

-Caracterizar el antígeno en cuanto a sus propiedades físico-químicas, sensibilidad a enzimas e identificación por inmunotransferencia de los polipeptidos antigenicos.

## MATERIAL Y METODOS

Se investigó la prevalencia de anticuerpos anti-RNP-r en 50 pacientes con LES, en el suero de 36 pacientes con ESP, 21 con EMTD, 100 con AR, 30 con SSP, 23 con FM/DH y 25 sujetos clínicamente sanos. El diagnóstico en cada grupo fue establecido en concordancia con los criterios respectivos propuestos por la American Rheumatism Association (ARA). (14-20).

## Caracterización de Autoanticuerpos

Los autoanticuerpos antinúcleo v/o anticitoplasma en diluciones progresivas del suero, fueron determinados utilizando la prueba de IFI y como sustrato hígado de rata (21), (anexo I). Para definir la especificidad de los autoanticuerpos, se utilizó la prueba de IDD en gel de agarosa al 0.6% en solución salina amortiguada con fosfatos, (anexo II) contra un extracto soluble de timo de conejo (ETC), (anexo III). Este método nos permitió distinguir anticuerpos tales como anti-Sm, RNP-n (U1), RNP-r, La/SSB, comparando con sueros prototipo. Con el mismo método pero con extracto de bazo humano (EBH), (anexo IV), se determinó el anticuerpo anti-Ro/SSA. La especificidad del anticuerpo (RNP-r) se estudió con un extracto de ribosomas (ER), (anexo V), purificados de acuerdo al método de Littlefield, (22-24).

## Propiedades físico-químicas del antígeno

El efecto de la temperatura se determinó congelando y descongelando el ETC 5 veces: así como conservándolo a 4°C y -70°C, o incubándolo a 37°C y 56°C por 1/2, 1, 2, 3, 6 y 12 hrs. El efecto de las variaciones en el pH se investigó dializando el ETC contra soluciones isotónicas con buffer 10 mM de glicina-ácido clorhídrico (pH 7.2), acetato (pH 4.0), fosfatos (pH 6.0 y 7.3), boratos (pH 8.3) y carbonato (pH 9.0). Se efectuó dialisis contra

agua destilada para disminuir la fuerza iónica. Todos estos procedimientos se hicieron a temperatura ambiente. La sensibilidad a nucleasas y proteasas se determinó incubando el ETC con las enzimas DNAsa, RNAsa y tripsina con una relación sustrato-enzima de 10:1, en condiciones óptimas para acción enzimática y durante periodos variables de 0 a 60 minutos, al final de los cuales se terminó la reacción enfriando la mezcla.

Para trabajar con una concentración máxima de antígeno se utilizó ER y se practicó una electroforesis por el método de Laemmli (25) en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones no reductoras, (anexo VI); el material separado en la electroforesis se transfirió a papel de nitrocelulosa como ha sido descrito por Towbin (26) con ligeras modificaciones y finalmente se hizo reaccionar con sueros de pacientes con LES y otras enfermedades reumáticas que contenían anticuerpos específicos contra antígenos Sm, Ro/SSA, La/SSB, RNP-n (U1) y RNP-r, usando como segundo anticuerpo anti-IgG humana específica contra cadenas pesadas conjugada con peroxidasa y la reacción se reveló con peróxido de hidrógeno y diamino-bencidina, (anexo VII).

## RESULTADOS

En los sueros con anticuerpos anti-RNP-r la IFI en sustrato xenogénico mostró depósitos de IgG en el citoplasma de los hepatocitos de rata, independientemente de la presencia o no de depósitos intranucleares. Los depósitos citoplásmicos tenían un aspecto moteado, con partículas coalescentes de pobre definición en sus límites, lo que indica de la localización celular del anticuerpo.

### Prevalencia de anticuerpos anti-RNP-r en enfermedades reumáticas

En 50 pacientes con LES encontramos seis casos con anticuerpos anti-RNP-r, un caso entre 30 pacientes con SSP y ninguno en 38 pacientes con ESP, 21 de EMTC, 100 de AR, 23 de PM/DM y 25 sujetos normales. Tabla 1.

TABLA 1

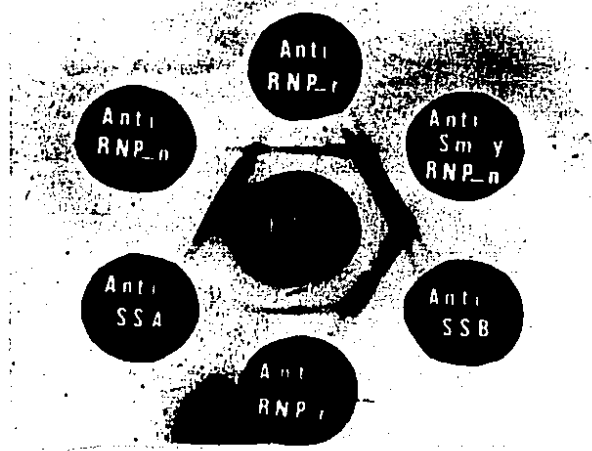
#### Anticuerpos anti-RNP-r en enfermedades reumáticas

Enfermedad	Pacientes	Anti-RNP-r
LES	50	6 (12%)
ESP	38	0
EMTC	21	0
AR	100	0
SSP	30	1 (3.3%)
PM/DM	23	0
Normales	25	0

## Características físico-químicas del antígeno

Estos sueros al reaccionar en IDD contra ETC mostraron una identidad inmunológica parcial con suero específico anti-RNP-n (U1). no hubo ninguna identidad con sueros anti-Sm. anti-Ro/SSA. anti-La/SSB. Figura 1.

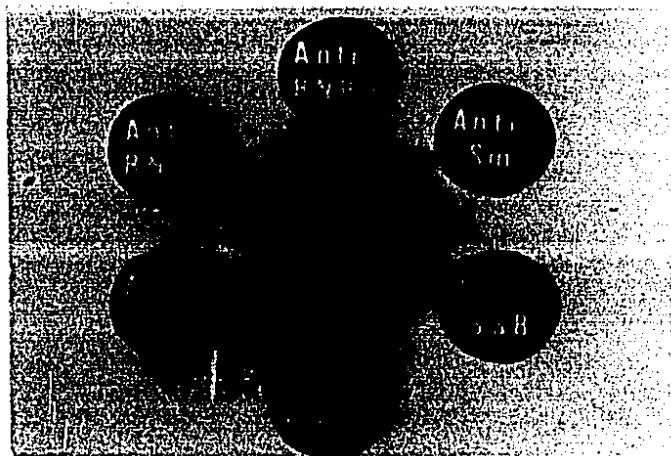
FIGURA 1



IDD de sueros con antígenos contra ETC. En los pozos 1 y 4 suero anti-RNP-n. en el pozo 2 suero anti-Sm y anti-RNP-n (U1), esta última especificidad (línea posterior), hace identidad parcial con el sistema RNP-n. En el pozo 6 hay un suero monoespecífico anti-RNP-n (U1), que confirma la reacción de identidad parcial. En el pozo 3 suero anti-SSB. En el pozo 5 un suero anti-SSA, que no forma precipitado inmune contra el ETC.

Cuando se usó ER en IDD los sueros con especificidad anti-RNP-n (U1), Sm. Ro/SSA y La/SSB. no formaron precipitado inmune, mientras esto si ocurrio con el suero con especificidad anti-RNP-n. Figura 2.

FIGURA 2



IDD contra ER. Solo el suero anti-RNP-n forma dos bandas de precipitacion. Los sueros anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm y anti RNP-n (U1) son negativos.

El antígeno reactivo con el anticuerpo sérico existe en tejidos de mamíferos, al menos en las células del hígado de rata, como lo muestra la IFI y en el polvo acetónico de timo de conejo. El antígeno asociado a organelos citoplásmicos, el ribosoma es la fuente principal de antígeno y al usar ER, los sueros reactivos con identidad parcial con anti-RNP-n (U1) son capaces de formar precipitado inmune específico en la IDD. La naturaleza del antígeno es ribonucleoproteica y sus características físico-químicas permiten diferenciarlo del antígeno nuclear RNP-n (U1). El antígeno RNP-r tiene una sensibilidad a temperatura que lo diferencia del antígeno RNP-n (U1) pues este resiste más la congelación-descongelación y requiere de horas para ser destruido por calentamiento a 56°C. Tabla 2.

#### Sensibilidad a Enzimas

El antígeno RNP-r resiste la acción de la DNasa. Es sensible a RNasa y a tripsina, por tanto es una ribonucleoproteína y su sensibilidad a enzimas es idéntica a la del antígeno RNP-n (U1). Tabla 2.



TABLA 2

Características fisico-químicas y sensibilidad a enzimas de los antígenos RNP-r y RNP-n (U1)

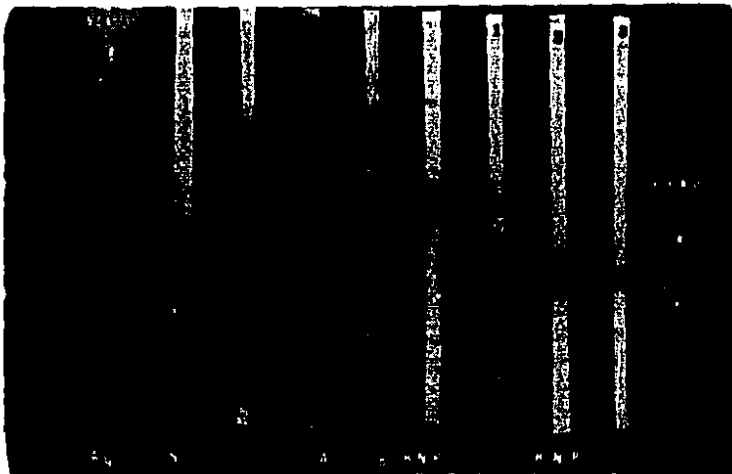
Tratamiento al antígeno	RNP-r	RNP-n (U1)
Temperatura:		
56 °C	S 30 min	S 6 h
37 °C	S 4 h	S 6 h
4 °C	R s	R m
Comp/Descomp	S	R
Dialisis:		
pH	6-7.4	4-11
Enzimas:		
DNAsa	R	R
RNAsa	S	S
Tripsina	S	S

R = Resistente      S = Sensible      min = minutos      h = hora  
 s = semanas      m = meses

## Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunotransferencia

Se identificaron en la electroforesis del ER aproximadamente 40 fracciones ribosomicas. posteriormente se realizo el paso de estas fracciones ribosomicas a papel de nitrocelulosa y se puso en contacto con anticuerpos a RNP-n y despues de revelada la reaccion inmunologica se identificaron 2 bandas o fracciones ribosomicas con capacidad antigenica denominadas nA (38.000 D) y nB (34.000 D). Cuando la inmunotransferencia se hizo usando sueros con especificidad distinta, el suero con anticuerpo anti-RNP-n (U1), Ro/SSA, La/SSB, Sm y suero normal, no mostraron reaccion en la zona de las bandas nA y nB. Figura 3.

FIGURA 3



Inmunolectrotransferencia de ER. La columna inicia representa la electroforesis del ER. La inmunotransferencia usando suero humano normal, suero con anti-Sm, SSA, SSB y RNP-n (U1), no muestra ninguna reactividad. En las tres ultimas columnas, el experimento se hizo con suero de conejos con ISS, que tiene anticuerpos anti-RNP-n, observandose dos bandas reactivas nA (38 KD) y nB (34 KD).

## DISCUSION

En este trabajo se estudio la prevalencia de los anticuerpos dirigidos a RNF-r en sueros de pacientes con distintas enfermedades reumaticas. Ademas se caracterizo al antigeno en cuanto a sus propiedades fisico-quimicas y sensibilidad a enzimas. Tambien se identificaron los polipeptidos antigenicos, para ello utilizamos la prueba de deteccion de AAN por IFI por ser la mas sensible para este proposito. realizamos la identidad inmunologica de los AAN por medio de doble difusion en agar, utilizando extractos antigenicos adecuados asi como sueros prototipo. Por medio de digestion enzimatica definimos la naturaleza del antigeno y por cambios de temperatura y fuerza ionica pudimos determinar sus propiedades fisico-quimicas. finalmente utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunotransferencia localizamos los polipeptidos antigenicos reactivos.

Encontramos que seis (12%) de nuestros pacientes con LES tenian anticuerpos anti-RNF-r: en todos estos sueros hubo un patron de IFI citoplasmica con depositos de aspecto moteado irregular. Sólo a un paciente con diagnostico de SSF se le detectaron anticuerpos anti-RNF-r. Por medio de electroforesis analitica de ER e inmunotransferencia con anticuerpos sericos especificos anti-RNF-r se identificaron dos proteinas antigenicas reactivas, se observo ademas que estos anticuerpos pueden ser detectados utilizando IDD contra ETC ó ER.

Los anticuerpos contra componentes citoplásmicos incluyen aquellos dirigidos contra ribosomas y han sido identificados en LES y otras enfermedades reumáticas con una frecuencia de 13 a 24%. (27-31). En el presente estudio se encontraron con una frecuencia del 12%. la discrepancia en la detección de estos anticuerpos puede deberse al número de sujetos estudiados y al procedimiento técnico utilizado, ya que al practicar IDD contra ETC. existe una precipitación inmune que tiene identidad parcial con RNP-n (U1). y la susceptibilidad a digestión enzimática muestra que el antígeno ribosómico es una ribonucleoproteína. Por tanto si se usa el método de hemaglutinación pasiva con tratamiento enzimático con RNAsa como única prueba para diferenciar entre antígenos extraíbles del núcleo, invariablemente se confundirá la especificidad del anticuerpo que se le clasificará como anti-RNP-n (U1).

El antígeno RNP-n es, probablemente un antígeno conformacional y la modificación de su estereoquímica por efectos físicos destruye sus determinantes antígenicos. En apoyo a esta conclusión debe contarse el estrecho rango del antígeno ante fluctuaciones de pH, que es claramente distinto al de otros, solo conserva reactividad entre 6.0 y 7.4 perdiéndose esta muy rápidamente mientras que el antígeno RNP-n (U1) resiste al tratamiento a pH entre 4-11 hasta por 12 horas. Un criterio menor de diferenciación es la estabilidad del antígeno ribosómico. Mientras que el ETC conservado a - 70°C por periodos de 6 meses a

2 años sigue siendo fuente de antígenos nucleares como Sm y RNP-n (U1), el antígeno ribosómico (RNP-r) desaparece en sólo semanas en las mismas condiciones de almacenamiento.

En los últimos años se ha introducido a la inmunquímica la técnica de transferencia de proteínas (antígenos) separados en gel de poliacrilamida hacia un papel de nitrocelulosa, seguido de una reacción antígeno-anticuerpo que identifica a los componentes antigénicos en una mezcla compleja. Esta técnica es superior a la tradicional de IDD e IEF y ofrece la posibilidad de efectuar estudios moleculares que hasta hace poco eran impracticables. Con esta metodología, encontramos que entre las numerosas bandas protéicas que contiene el ER hay, al menos, dos reconocidas por anticuerpo humano obtenido de diferentes enfermos con LES, estas proteínas tienen pesos moleculares de 36 y 34 KD. Este hallazgo resulta concordante con resultados reportados previamente. (32-33).

Como ya se ha señalado al practicar una prueba de IDD contra ETC existe una identidad inmunológica parcial entre RNP-r y RNP-n (U1), esta precipitación inmune con imagen de identidad inmunológica parcial en la IDD semeja la descrita en el caso de sistemas antígeno-anticuerpo Sm y RNP-n (U1). (34). Recientemente al conocer en detalle la estructura molecular de los antígenos Sm y RNP-n (U1) se mostró que comparten tanto la estructura peptídica como el ácido nucleico: el antígeno Sm contiene péptidos A, B, B1, C, D, E, F y G y RNA de serie U1, 2, 4, 5 y 6,

mientras RNP-n (U1) contiene solo los peptidos A y C y RNA U1.(35-36); la pretendida identidad parcial puede no serlo y tratarse de una reacción de inhibición al reaccionar el anticuerpo con partículas de antígeno Sm libre, no ligado a RNP-n (U1), formando un espolón en la línea de precipitación entre anticuerpos y complejos Sm-RNP-n (U1). Esta explicación hipotética que deberá probarse en el futuro, podría ser aplicable a la situación entre RNP-n (U1) y RNP-n.

Los estudios físico-químicos son capaces de diferenciar entre antígenos RNP, pues hay diferencias de estabilidad en almacenamiento, ante modificaciones ácido-básicas y cambios en fuerza iónica que además sugieren que los epitopes ribosómicos probablemente son conformacionales. Sin embargo, tales estudios requieren mucho tiempo y no son aplicables al trabajo cotidiano para identificar un anticuerpo. En cambio, es recomendable el uso de varios extractos antigénicos para la caracterización de la especificidad inmunológica de autoanticuerpos. Así con ETC, EBH y ER, usando técnicas sencillas de IDD se logra diferenciar con certeza entre los diversos anticuerpos presentes en el suero de pacientes con enfermedades reumáticas.

Nuestros estudios hasta ahora se han limitado al análisis e inmunotransferencia de las fracciones ultracentrífugas ribosómicas antigénicas. No hemos estudiado la composición de RNA de la molécula, hasta ahora desconocida, y, tendrá que investigarse

además el efecto que ejercen estos autoanticuerpos sobre los ribosomas y así poder llegar a una mejor comprensión de la fisiopatogenia de este tipo de padecimientos.

En suma hemos estudiado la prevalencia de anticuerpos antirribosoma en el suero de pacientes con diversas enfermedades reumáticas generalizadas con participación inmune, confirmando que estos anticuerpos ocurren con relativa frecuencia en LES, si bien pueden aparecer ocasionalmente en otras condiciones. Además, usando técnicas de gran sensibilidad y especificidad se logró identificar componentes proteicos de la molécula que se comportan como antígenos.

## REFERENCIAS

- 1.- Notman D F, Kurata N, Tan EM: Profiles of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Inter Med* 1975;83:464-469.
- 2.- Reyes P A, Arroyave C: Anticuerpos antinucleares en enfermedades reumaticas generalizadas. *Biometrica* 1977;2:1.
- 3.- Tan E M, Reyes P A, Fritzler M J: Autoantibodies as biological markers. In: Ruddon R W, ed. *Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects*. Elsevier North Holland. 1978:399.
- 4.- Akizuki M, Powers R, Holman H R: A soluble protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome. *J Clin Invest* 1977;89:264-272.
- 5.- Winn D M, Wolfe F, Harmon D, et al: Characterization of a distinct nuclear acidic protein antigen (MA) and clinical findings in systemic lupus erythematosus patients with MA antibodies. *J Clin Invest* 1979;64:820-823.
- 6.- Scopelitis E, Biundo J J, Alsbaugh M A: Anti SS-a antibody and other antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1980;23:287-293.
- 7.- Venrooij W J: Autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein components. *J. Rheum* 1987; (supp 13) 14:78-82.
- 8.- Bernstein R M and Mathews M B : Autoantibodies to intracellular antigens, with particular reference to transfer RNA and related proteins in myositis. *J. Rheum* 1987; (supp 13)14:83-88.
- 9.- Sturgill B C, Carpenter R R: Antibody to ribosomes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1965;8:2.
- 10.- Schur P H, Moros L A, Kunkel H G: Precipitating antibodies to ribosomes in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Immunochemistry* 1967;4:447-453.
- 11.- Lamou E W, Bennett J C: Antibodies to ribosomal ribonucleic acid in patients with lupus erythematosus. *Immunology* 1970;19:438-442.
- 12.- Koffler D, Miller T E, Lanita R G: Studies on the specificity and clinical correlation of antiribosomal antibodies in SLE sera. *Arthritis Rheum* 1979;22:463-470.



- 13.- Miyachi K, Tan E M: Antibodies reacting with ribosomal ribonucleoprotein in connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 1979;22:87-93.
- 14.- Tan E M, Cohen A S, Fries J F, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
- 15.- Ropes M W, Bennett G A, Cobb S, et al: Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 1958;9:175-176.
- 16.- Talal N: Sjogren's syndrome and connective tissue disease with other immunologic disorders. In: Mc Carty D J Jr, ed. *Arthritis and Allied Conditions*. Philadelphia: Lea and Febiger 1979:810-824.
- 17.- Sharp G C, Irvin W S, Tan E M, et al: Mixed connective tissue disease an apparently distinct disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972;52:148-159.
- 18.- Masi A T, Rodnan G P, Medsger T A, et al : Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-590.
- 19.- Rodnan G P, Medsger T A, Buckingham R B: Progressive systemic sclerosis CREST syndrome, observations on the natural history and late complications in 90 patients. *Arthritis Rheum* 1975;18:423-432.
- 20.- Bohan A, Peter J B: Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975;292:344-347.
- 21.- Fritzler M J: Fluorescent antinuclear antibody test. In: Rose NR, Friedman H, eds. *Manual of Clinical Immunology*. 2nd ED. Chap 113. Am Soc Microbiol 1980,852.
- 22.- Tan E M, Kunkel H G: Characteristic of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1966;96:464-470.
- 23.- Clark G, Rechlin M, Tomasi T B: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1968;102:117-122.
- 24.- Littlefield J W, Keller E B, Gros J, et al: Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J Biol Chem* 1955;217:11-123.

- 25.- Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- 26.- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
- 27.- Sturgill B C, Carpenter R R: Antibody to ribosomes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1965;8:2.
- 28.- Schur P H, Moroz L A, Kunkel H G : Precipitating antibodies to ribosomes in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Immunochemistry* 1967;4:447-453.
- 29.- Lamou E W, Bennett J C: Antibodies to ribosomal ribonucleic acid in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 1970;19:439-442.
- 30.- Koffler D, Miller T E, Lahita R G : Studies on the specificity and clinical correlation of antiribosomal antibodies in SLE sera. *Arthritis Rheum* 1979;2:463-470.
- 31.- Miyachi K, Tan E M: Antibodies reacting with ribosomal ribonucleoprotein in connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 1979;22:87-93.
- 32.- Francoeur A M, Peebles C L, Heckman J J, et al: Identification of ribosomal protein autoantigenes. *J Immunol* 1985;135:2378-2384.
- 33.- Elkouk B, Fadnassa A F, Foster C L: Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med* 1985;162:459-471.
- 34.- Northway J D, Tan E M: Differentiation of antinuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol* 1972;1:140-154.
- 35.- Lerner M R, Steitz J A: Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3495-3497.
- 36.- Eisenberg R A, Klarner D G, Cohen P L: The polypeptide structure of the Sm and RNP nuclear antigens. *Nat Immunol* 1983;20:187-195.

## ANEXO. METODOLOGIA EMPLEADA.

### I. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA

- 1.- Material.
  - a.- Metasilicato de sodio al 2.5% en agua destilada.
  - b.- Acetona.
  - c.- Glicerina.
  - d.- Buffer barbital 0.05M pH 8.6
  - e.- Solución para cubrir tejido, partes iguales de c y d.
  - f.- PBS 0.05M pH 7.2-7.4.
  - g.- Hígado de rata.
  - h.- Control positivo en alicuotas congeladas.
  - i.- Antisuero de cabra contra IgG humana, conjugado a isotiocinato de fluoresceína.
  - j.- Criostato.
  - k.- Agitador magnético.
  - l.- Microscopio para fluorescencia.
  - m.- Pipetas pasteur, pipetas graduadas, reloj, gradillas, porta y cubre objetos.
- 2.- Procedimiento.
  - a.- Pretratamiento de las laminillas. Colocar 5 minutos en la solución de metasilicato de sodio al 2.5%, dejar secar a temperatura ambiente.
  - b.- Preparación de cortes o secciones. Hígado de rata incluido en tissue tek (Ames. Miles), almacenado a -70°C. En criostato realizar cortes de 4u de espesor. Colocar dos cortes en cada laminilla, almacenar a -20°C.
  - c.- Preparación de sueros y laminillas. Colocar las laminillas en acetona fría por 10 minutos, dejarlas secar a temperatura ambiente. Realizar dilución del suero a partir de 1:20. Identificar la laminilla en el extremo izquierdo.
  - d.- Cubrir el tejido con 100 ul de la dilución respectiva del suero. Una vez iniciado este proceso no se debe de secar la laminilla.
  - e.- En una laminilla colocar control positivo y negativo.
  - f.- Incubar 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
  - g.- Lavar 2 veces de 5 minutos c/u con solución de PBS.
  - h.- Cubrir cada corte con 20 a 50 ul de antisuero de cabra anti-IgG humana conjugada con isotiocinato de fluoresceína.
  - i.- Incubar 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
  - j.- Lavar dos veces como anteriormente se indico.
  - k.- Colocar una gota de solución para cubrir tejido a cada uno de los cortes y ponerle un cubreobjeto.
  - l.- Leer en microscopio para fluorescencia.

## II. IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNODIFUSION DOBLE (IDD)

### 1.- Material.

- a.- Agarosa, bacto agar o agar noble.
- b.- Cajas de petri.
- c.- Buffer de PBS 0.05M pH 7.2
- d.- Fuente antigenica. Extracto de timo de conejo, extracto de bazo humano, extracto ribosomal.
- e.- Sueros control positivo anti-Sm, RNP-n (U1), RNP-r, Ro/SSA, La/SSB.

### 2.- Procedimiento.

- a.- Agarosa al 0.6% en PBS. Fundir en baño maria, hasta clarificar.
- b.- Llenar las cajas de petri con agarosa 0.6% .
- c.- Realizar el corte en la agarosa, en forma hexagonal, octagonal, etc.
- e.- Colocar el antígeno, control positivo y suero a identificar en el lugar respectivo.
- f.- Dejar difundir de 24 a 48 horas y verificar si existe halo de migración y si existe identidad total, parcial o no identidad, con el suero control positivo.

## III. OBTENCION DE EXTRACTO DE TIMO DE CONEJO (ETC)

### 1.- Material.

- a.- Polvo acetónico de timo de conejo (Pect-Freez).
- b.- Buffer de PBS 0.05M pH 7.2.
- c.- Inhibidores de proteasas, EDTA, PMSF, Acido epsilen amino caproico, n-metilmaleimida. (Sigma).
- d.- Agitador magnetico.
- e.- Centrifuga refrigerada 20,000 rpm.
- f.- Liofilizadora.

### 2.- Procedimiento.

- a.- Pesar 100 mgr de polvo acetónico de timo de conejo por cada ml de solución de PBS que contenga 0.001M de cada uno de los inhibidores de proteasas.
- b.- Realizar agitación lenta continua a 4°C por 4 horas.
- c.- Centrifugar a 12.500G por 15 minutos a 4°C.
- d.- Tomar sobrenadante.
- e.- Liofilizar.
- f.- Usar a una concentración de 10 mgr por ml, para detectar por IDD anticuerpos anti Sm, RNP-n (U1), RNP-r, La/SSB.

#### IV. OBTENCION DE EXTRACTO DE BAZO HUMANO (EBH)

##### 1.- Material.

- a.- Bazo humano. Si es de autopsia que sea de las primeras 4-6 horas post-mortem.
- b.- Buffer de Tris-HCl 0.05M, 0.15M NaCl, pH 7.2.
- c.- Buffer de Tris-HCl 0.05m, 0.3M NaCl, pH 7.2.
- d.- Inhibidores de proteasas EDTA, PMSF, ácido epsilen amino caprónico, n-metilmalimida.
- e.- Resina y material para montar una columna de DE-52 (Whatman).
- f.- Membranas para diálisis.
- g.- Politrón.
- h.- Ultracentrifuga.
- i.- Espectrofotometro con luz UV.

##### 2.- Procedimiento.

- a.- Decapsular y cortar en trozos pequeños el bazo humano, mezclando volumen a volumen con el buffer de Tris-HCl 0.05M, 0.15M NaCl pH 7.2, con inhibidores de proteasas a una concentración de 0.001M. Luego politronar hasta obtener una mezcla homogénea. Centrifugar 3 horas a 105,000G a 4°C, coleccionar el sobrenadante y dializar toda la noche contra el mismo buffer, en cuarto frio.
- b.- En una columna de 2.5 x 40 cm. de DE-52 equilibrada con la misma solución amortiguadora, aplicar el extracto total de bazo humano, lavar extensivamente y posteriormente eluir con buffer de Tris-HCl 0.05M, 0.3M NaCl pH 7.2, con inhibidores de proteasas a una concentración de 0.001M. Coleccionar fracciones de 10 ml y caracterizarlas en espectrofotómetro a 280 nm de longitud de onda, mezclar todas aquellas fracciones que nos den una lectura superior a 1.2. Liofilizar, almacenar a -20°C. Utilizar a una concentración de 10 mgr/ml para identificar por IDD anticuerpos anti-Ro/SSA y anti La/SSE.

#### V. OBTENCION DE EXTRACTO RIBOSOMAL (ER)

##### 1.- Material.

- a.- Sacarosa.
- b.- Desoxicolato de sodio
- c.- Glicil-glicina.
- d.- Inhibidores de proteasas, EDTA, PMSF, ácido epsilen amino caprónico, n-metilmalimida. (Sigma).
- e.- Hígado de rata.
- f.- Politrón.
- g.- Centrifuga de 20,000 rpm.
- h.- Ultracentrifuga.
- i.- Espectrofotómetro.

2.- Procedimiento.

- a.- Cortar en pequeños trozos el hígado de rata y colocarlo volúmen a volúmen en una solución de sacarosa 0.25M, que contenga inhibidores de proteasas a una concentración de 0.001M. homogeneizarlo en politron, centrifugar a 18,000G a 4°C por 10 minutos. colectar el sobrenadante, ultracentrifugarlo a 105,000G a 4°C por 45 minutos, colectar el precipitado y hacerle determinación de proteínas resuspendiendo en una solución de desoxicolato de sodio al 0.4%, 0.05M de glicil-glicina pH 8.0, con inhibidores de proteasas a una concentración de 0.001M. por cada 15 mgr de proteína, añadir 10 ml de la solución de desoxicolato. Una vez resuspendido politronar hasta obtener una mezcla uniforme, posteriormente centrifugar a 105,000G por 3 horas a 4°C. Colectar el precipitado, liofilizarlo, almacenarlo a -20°C y utilizarlo a una concentración de 10 mgr/ml para detectar por IDD anticuerpos anti-RNF-r.

VI. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

1.- Material.

- a.- Solución Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.8%.
- b.- Solución Tris-HCl 1.5M pH 8.8.
- c.- Solución Tris-HCl 0.5M pH 6.8.
- d.- Solución SDS al 10%
- e.- Persulfato de amonio al 10%
- f.- Buffer de corrimiento, pH 8.3
- |           |       |
|-----------|-------|
| Glicina   | 72 gr |
| Tris base | 15 gr |
| SDS       | 5 gr  |
| Aforar    | 5 lt  |
- g.- Buffer de muestra.
- |                    |        |
|--------------------|--------|
| Tris 0.5M pH 6.8   | 10 ml  |
| SDS 10%            | 10 ml  |
| Glicerol           | 10 ml  |
| Azul de bromofenol | 30 mgr |
| Agua destilada     | 19 ml  |
- DTT 0.5M al 10% del volúmen final de la muestra.
- h.- Solución de tinción.
- |                      |        |
|----------------------|--------|
| Coomassie Blue R-250 | 1 gr   |
| Metanol              | 225 ml |
| Acido Acético        | 50 ml  |
| Agua destilada       | 225 ml |
- Agitar 4 horas y filtrar. Tratar el gel de un día para otro, ó por un mínimo de 1 hora.
- i.- Solución desteñidora.
- |               |      |
|---------------|------|
| Acido acético | 7.5% |
| Metanol       | 5 %  |
- j.- Temod, DTT.
- h.- Equipo para electroforesis horizontal.

## 2.- Procedimiento.

- a.- Armar la cámara de electroforesis, colocar el gel separador en la parte inferior del slab, dejar que polimerice aproximadamente 30 min. y posteriormente en la parte superior poner el peine y el gel concentrador, esperar 20 a 30 min. para que polimerice y después colocar la ó las muestras en el carril correspondiente, poner la cámara que contendrá al buffer de la parte superior, colocar el slab y la cámara superior en la de electroforesis, iniciar corrimiento a 40 mA por slab. Después de 4 - 6 hrs. de corrimiento, colocar el gel en solución de tinción, por un mínimo de 1 hr.

GEL	SEPARADOR	7.5%	10%	12.5%
Acrilamida 30% Bis-acrilamida 0.8%		7.5 ml	10 ml	12.5 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8		7.5	7.5	7.5
Agua destilada		14.7	12.2	9.7
SDS 10%		0.6	0.6	0.6
Persulfato de amonio 10%		0.2	0.2	0.2
Temed		20 ul	20 ul	20 ul

GEL	CONCENTRADOR	4%	5%	6.25%
Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.8%		4 ml	5 ml	6.25 ml
Tris-Hcl 0.5M pH6.8		7.5	7.5	7.5
Agua destilada		18.4	17.1	15.9
SDS 10%		0.3	0.3	0.3
Persulfato de amonio 10%		0.1	0.1	0.1
Temed		15 ul	15 ul	15 ul

## VII. INMUNELECTROTRANSFERENCIA

### 1.- Material

- a.- Gel de poliacrilamida sin teñir.  
b.- Papel de nitrocelulosa.  
c.- Buffer de transferencia.  
Tris-Base 0.025 M  
Glicina 0.192 M  
Agua destilada cbp.  
d.- Buffer de fosfatos-salina (PBS 0.05 M).  
e.- Albumina serica bovina, tween 20, 3.3 'Diamino-bencidina,  
Peroxido de hidrogeno.  
f.- Equipo para inmunotransferencia.

### 2.- Procedimiento.

- a.- Colocar el gel hacia el lado negativo y el papel de nitrocelulosa hacia el lado positivo de la cámara de transferencia, transferir las proteínas del gel de acrilamida al papel de nitrocelulosa a 250 mA por tres horas en cuarto frío.

b.- Tratamiento del papel de nitrocelulosa. El papel con las proteínas transferidas se cubre con una solución de PBS-ASB 3% y azida 0.1% a 4°C y con agitación continua por tres hrs. o toda la noche. Lavar el papel tres veces, cada una de 10 min. con PBS. Diluir el primer anticuerpo en PBS-ASB al 3% a la concentración deseada. e incubarlo por una hr. a temperatura ambiente con agitación continua. Lavar dos veces por 10 min. c/u con PBS-Tween 20 al 0.3% y tres veces con PBS, cada cambio de 10 min. Incubar con el segundo anticuerpo diluido en PBS-ASB 3% . por una hora a temperatura ambiente con agitación. Lavar como se realizó después de la incubación con el primer anticuerpo.

c.- Detección de las bandas de proteína sobre el papel de nitrocelulosa. Con 3,3'Diamino-Bencidina o 1,4 Cloro-Naftol. Disolver 50 mgr de DAB en 100 ml de PBS, agregar 10 ul de peróxido de hidrogeno al 30%. o 30 mgr de 1,4 cloro-naftol en 10 ml de metanol mas 50 ml de PBS y agregar 50 ul de peróxido de hidrógeno al 30%. Para parar la reacción se ponen las tiras de papel en agua con azida de sodio al 0.1%. Cuando se revelan las bandas de proteínas con DAB, las tiras de papel se pueden secar. Para teñir el papel de nitrocelulosa y poder observar el patrón de como transfirieron las proteínas, se tiñen con amido negro.

Solución de Tinción con Amido Negro.

Amido negro 0.1 %

Metanol 45 %

Acido acético 10 %

Agua destilada cbd.

Solución desteñidora.

Acido acético 2 %

Metanol 90 %

Agua destilada cbd.

Colocar el papel de nitrocelulosa con el colorante por 5 min. en agitación constante. después se pasa a la solución desteñidora por 5 min. con agitación constante, (el papel se pone blando) pasar a agua destilada.



## Agradecimientos:

A todo el personal del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez" y al M. en C. Felipe Mendoza Pérez, por su valiosa colaboración en la realización del trabajo experimental.