



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"



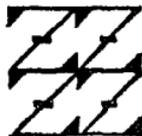
ANTICUERPOS ANTI-DNA.- APLICACION Y UTILIDAD DE UNA PRUEBA INMUNOENZIMATICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :

JOSE ALBERTO SANTANA RAMIREZ

U N A M  
ZARAGOZA



LO DEMUESTRO  
EN MI  
DE MIUESTRA DIFUSION

MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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

INTRODUCCION	8
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO	9
ANTICUERPOS CONTRA EL DNA	13
ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS EXTRAIBLES DEL NUCLEO	16
FUNDAMENTACION DEL TEMA	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVOS	21
HIPOTESIS	22
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	33
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS	61

## INTRODUCCION

En los pacientes con padecimientos reumatológicos y específicamente en las denominadas enfermedades del tejido conectivo, hay una amplia gama de autoanticuerpos. Estos anticuerpos incluyen especificidades para una gran variedad de componentes propios, tales como diferentes estructuras nucleoprotéicas, ácidos nucleicos, inmunoglobulinas, moléculas de la membrana celular, receptores para hormonas, tiroglobulina y componentes de la mielina (1).

Aunque ciertos autoanticuerpos, como los anti-ácido desoxiribonucleico (DNA) en el lupus eritematoso generalizado (LEG) y los anti-receptor de acetilcolina en la miastenia gravis, son probablemente mediadores de la lesión tisular, es difícil precisar los mecanismos fisiopatológicos que promueven su aparición y su participación en el daño tisular que caracteriza a las enfermedades autoinmunes. El estudio de los autoanticuerpos ha contribuido a una clasificación más precisa de varias enfermedades constituyendo marcadores serológicos que a menudo se emplean para fines de diagnóstico. Algunos ejemplos de su utilidad clínica son la estrecha correlación de los anticuerpos anti-DNA y los anticuerpos contra algunas ribonucleoproteínas (Sm) con el LEG, de los anticuerpos contra sintetasas del ácido ribonucleico (Jo-1) con la polimiositis y de los anticuerpos anti-topoisomerasa-I (Scl-70) y anticentrómero con la esclerodermia (1,2,3).

La prueba de anticuerpos antinucleares (AAN) por

inmunofluorescencia indirecta se ha convertido en una prueba sumamente útil para el estudio del LEG y aparecen en practicamente todos los pacientes con esta enfermedad.

Los AAN se fijan a epitopes en la estructura helicoidal de los ácidos nucleicos, a componentes de la cromatina (en particular las histonas), o a ribonucleoproteínas. De estos, los AAN dirigidos contra la cromatina y las ribonucleoproteínas son los más prominentes. En el LEG, los AAN exhiben reactividad variable usando sustratos homólogos ó heterólogos. Además, la sensibilidad puede aumentar y pueden obtenerse títulos más altos usando cultivos de células HeLa o HEP-2 en división activa. Alrededor del 5% de los sueros de LEG son negativos para AAN cuando se usan núcleos de hígado de rata, pero pueden tener una reacción positiva con núcleos de células humanas. Los títulos altos de AAN tienen más probabilidad de ser clinicamente significativos y el tipo de patrón tincional puede ser también de utilidad en el diagnóstico. Por otra parte los antígenos nucleares pueden extraerse fácilmente con solución salina, y esto ha derivado en el desarrollo de pruebas sencillas como la inmunodifusión doble para anticuerpos dirigidos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA) (4,5,6,7).

#### **LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

El LEG es una enfermedad inflamatoria crónica que parece resultar de una alteración compleja de la

inmunorregulación producida por la interacción de factores genéticos, hormonales y ambientales (4).

La descripción original de esta enfermedad se atribuye a Bielt (1822). En 1851, Cazenave usó por primera vez el nombre lupus eritematoso para describir las manifestaciones cutáneas de la enfermedad y específicamente las manifestaciones que se relacionaban con una forma de tuberculosis de la piel que se conocía como lupus vulgaris (lupus vulgar). El término lupus, que literalmente significa "lobo" en latín, se había usado para denotar la naturaleza destructiva de la lesión. La lesión roja no destructiva del lupus eritematoso se distinguió así, de la lesión destructiva del lupus vulgar. Aunque los pacientes de Cazenave tenían manifestaciones generalizadas, este autor enfatizó la descripción de las características cutáneas de la enfermedad. Kaposi, y luego Osler fueron, quienes enfocaron la atención sobre la naturaleza generalizada de la enfermedad, destacando el compromiso cerebral, respiratorio, cardíaco, gastrointestinal, renal, articular y hematológico.

La descripción en el laboratorio del fenómeno de lupus eritematoso (LE) por Hargraves, Richmond y Morton, y los estudios subsecuentes de Haserick, mostraron que dicha célula era el resultado de un anticuerpo antinuclear, el cual era fagocitado (2,8,9,10).

Durante las tres últimas décadas el LEG ha surgido en todo el mundo como una enfermedad reumática muy importante.

Se ha informado una prevalencia de la enfermedad en varias poblaciones que va desde 1.9 casos por 100,000 habitantes hasta 400 casos por 100 000 habitantes. En investigaciones basadas en hospitales en algunos países, la prevalencia del LEG ha sobrepasado a la de la artritis reumatoide. Hay un acentuado predominio en las mujeres y la mayoría de las series informa una relación de mujeres a hombres de 9:1, e incluso una proporción más alta (hasta de 30:1) durante la edad reproductiva. El LEG parece ser más común en ciertos grupos raciales, particularmente entre los Negros y posiblemente los Chinos y otras poblaciones asiáticas. Además, se ha informado que la incidencia del LEG en ciertas familias es mayor que en la población general (2,4).

Los pacientes con LEG tienen típicamente una enfermedad que afecta a prácticamente todos los órganos y sistemas. Sin embargo, no siempre se afectan todos los sistemas simultáneamente. El curso clínico característico consta de exacerbaciones y remisiones cuya duración es variable, persistiendo con este comportamiento a través de varios años.

La Asociación Americana de Reumatología (ARA) que ha cambiado recientemente de nombre a Colegio Americano de Reumatología ha propuesto una serie de criterios de clasificación del LEG, fundamentados en las características más frecuentes e importantes en el estudio de grandes grupos de pacientes.

Estos criterios de clasificación están basados en los siguientes 11 puntos:

1. Eritema en alas de mariposa, que se refiere a la presencia de eritema fijo, plano ó con elevación sobre las regiones malares y dorso de la nariz, pero que puede extenderse a otras áreas de la cara.

2. Lesiones tipo lupus discoide que pueden aparecer habitualmente en cara y suelen presentar zonas atróficas.

3. Fotosensibilidad que se presenta a manera de erupción cutánea después de haber tenido exposición a los rayos solares.

4. Ulceras bucales que también se pueden presentar en la región nasofaríngea, y que pueden no ser dolorosas, por lo que habitualmente se descubren en la exploración física.

5. Artritis que no sigue un patrón específico, no es erosiva y habitualmente no produce deformaciones.

6. Serositis, ya sea en forma de derrame pleural (apreciado clínica o radiológicamente) o pericarditis que se puede detectar por medio del clásico frote pericárdico o por electrocardiograma. Menos frecuente se detectan otras formas de serositis como la ascitis.

7. Lesión renal que se manifiesta en el análisis de orina, con proteinuria o bien por medio de la presencia de cilindros de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.

8. Alteración neurológica manifestada por convulsiones o psicosis.

9. Alteración hematológica y que puede ser cualquiera de las siguientes:

- a) Anemia hemolítica con reticulocitosis
- b) Leucopenia menor de  $4000/\text{mm}^3$
- c) Linfopenia menor de  $1\ 500/\text{mm}^3$
- d) Trombocitopenia menor de  $100\ 000/\text{mm}^3$

10. Alteraciones inmunológicas en cualquiera de las siguientes variedades:

- a) Células LE
- b) Anticuerpos anti-DNA nativo (DNAN)
- c) Anticuerpos contra el antígeno nuclear
- d) Falsas reacciones positivas para la sífilis

y 11. Anticuerpos antinucleares por técnicas de inmunofluorescencia.

De acuerdo a lo anterior se considera que la presencia de 4 ó más de los puntos anteriormente señalados, son suficientes para poder confirmar la presencia del LEG, sin embargo, se debe de insistir que en cada paciente la presencia y grado de lesión es diferente, y que estos criterios abarcan los datos más importantes o frecuentes presentados por estos enfermos (3,11).

#### **ANTICUERPOS ANTI-DNA**

Desde su descubrimiento a fines de la década de 1960, los anticuerpos contra el DNA han constituido una de las pruebas más útiles en la reumatología.

El estudio inicial de la célula LE permitió identificar que este fenómeno resultaba de la ingestión de núcleos alterados por células fagocíticas, favorecida por la unión de los autoanticuerpos contra los complejos DNA-proteína, y que el mayor antígeno reconocido era un complejo DNA-histona. Más adelante, se encontró que los anticuerpos anti-DNA son las alteraciones clásicas que caracterizan al LEG, y que la alta avidéz del anticuerpo IgG contra el DNAn juega un papel importante en la inducción de algunas de las manifestaciones del LEG. En cuanto al nivel de estos anticuerpos, rara vez se encuentran títulos altos de anticuerpos anti-DNAn en otras condiciones distintas del LEG. Los niveles de estos anticuerpos reflejan actividad de la enfermedad, y aunque no siempre se relaciona con la afección de órganos, es común hallar títulos elevados en pacientes con LEG con afección renal. Por otra parte, generalmente se hallan valores normales o títulos bajos en otras condiciones que cursan con AAN, como la hepatitis crónica activa, el lupus inducido por medicamentos, la fibrosis pulmonar y el síndrome de Sjögren primario. Además en el lupus inducido por procainamida se ha demostrado que los anticuerpos están dirigidos contra algunas histonas específicas (5,6,12,13,14, 15).

El estudio de las características de estos autoanticuerpos contra el DNA ha revelado que existen diversas particularidades en estos marcadores serológicos. Ellos difieren entre sí en cuanto al isotipo, capacidad de

fijación del complemento, avidéz por el DNA, especificidad antigénica, carga e idiotipos que portan.

Existen por lo menos cuatro mecanismos por los cuales los anticuerpos contra DNA pueden fijarse a los tejidos:

1) Ellos pueden formar complejos inmunes del tamaño y carga adecuados, para ser atrapados en la membrana basal del glomérulo, piel y vasos sanguíneos.

2) También pueden unirse directamente al DNA o complejos DNA-histonas presentes en tejidos blanco.

3) Las subclases catiónicas pueden unirse a polianiones, tales como los proteoglicanos de membranas basales.

4) Los anticuerpos pueden unirse a antígenos diferentes del DNA o complejo DNA-histona presentes en membrana basal como laminina, fosfolípidos, o heparán sulfato (16).

Además de estas características de los anticuerpos contra DNA, las propiedades del DNA como antígeno y de los complejos inmunes son importantes en los mecanismos de inducción de la enfermedad.

Los anticuerpos contra el DNA inducidos por inmunización con bases púricas o pirimidicas, nucleósidos, o bien por oligonucleótidos usualmente tienen una alta especificidad para el inmunógeno. En contraste, los anticuerpos espontáneos contra DNA que se presentan en individuos con LEG son generalmente poliespecíficos y reaccionan con oligonucleótidos múltiples y varias formas de DNA. Como hemos destacado la detección de anticuerpos contra

DNAn es frecuentemente útil en el diagnóstico y manejo de pacientes con LEG, como se puede observar en el siguiente cuadro, que enfatiza que tienen gran aplicación en diferentes aspectos clínicos (16):

**CUADRO 1. UTILIDAD CLINICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-DNA**

Títulos altos de anticuerpos anti-DNAn

1. Tienen >90% de especificidad para LEG
2. A menudo indican enfermedad clínicamente activa y riesgo creciente de nefritis

Títulos bajos de anticuerpos anti-DNAn

1. Pueden ser detectados como anticuerpos anti-DNA desnaturalizado (DNAd)
2. Pueden ser encontrados en:
  - Lupus inducido por drogas
  - Artritis reumatoide
  - Síndrome de Sjögren
  - Infecciones crónicas
  - Enfermedad crónica del hígado
  - Envejecimiento

**ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS EXTRAIBLES DEL NUCLEO**

El LEG es una enfermedad, que presenta múltiples autoanticuerpos, y dentro de ellos los anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA) que han atraído considerablemente la atención por su utilidad como marcadores de diagnóstico, su valor como pruebas moleculares

para el estudio de la expresión de genes, y la posibilidad de aportar indicios para conocer los mecanismos básicos etiológicos de las enfermedades del tejido conectivo.

Los términos iniciales de algunas ribonucleoproteínas nucleares como el Sm y RNP surgieron a partir del estudio de pacientes con LEG (Sm, Smith) y de las primeras observaciones sobre las características fisicoquímicas de estos antígenos. La actividad antigénica podía ser diferenciada mediante el tratamiento con ribonucleasa ya que mientras el antígeno Sm era resistente a este tratamiento, el RNP constituido por un complejo de RNA-proteína era sensible a esta actividad enzimática.

A fines de la década de 1970, se demostró que solo algunos sueros de pacientes con lupus precipitaban selectivamente a estos conjuntos específicos de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, que revelaron tener gran importancia en el diagnóstico. A partir de entonces, se reportó que los anticuerpos anti-RNPn (U1), anti-Sm, anti-SSA(Ro) (Síndrome de Sjögren A) y anti-SSB(La) (Síndrome de Sjögren B) se encontraban con mayor frecuencia en pacientes con LEG y síndrome de Sjögren respectivamente.

Los anticuerpos anti-Sm se acompañan casi siempre de anticuerpos anti-RNP(U1) y los anti-SSA(Ro) se relacionan frecuentemente con anticuerpos anti-SSB(La), sin embargo, se pueden encontrar pacientes con anticuerpos anti-RNP(U1), y anti-SSA(Ro) y anti-SSB(La) solos. De ellos los anticuerpos anti-Sm se hallan casi exclusivamente en el LEG, y los

anticuerpos anti-SSA(Ro) suelen encontrarse relacionados con bloqueo cardiaco (2,6,,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28, 29,30,31,32,33,34).

Distintos estudios de los anticuerpos anti-ENA en diferentes poblaciones han mostrado que los anticuerpos anti-Sm y anti-RNP se encuentran más frecuentemente en pacientes negros que en pacientes blancos, mientras que los anticuerpos anti-SSA(Ro) y anti-SSB(La) aparecen con igual frecuencia entre las dos razas (33).

#### FUNDAMENTACION DEL TEMA

La presencia de los AAN y el estudio de su especificidad inmunoquímica permiten definir a los pacientes con LEG en diferentes tipos, de acuerdo a su comportamiento clínico, daño tisular y pronóstico. En este trabajo se evaluó la utilidad de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-DNA en pacientes con LEG y AAN positivos por inmunofluorescencia.

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La detección de anticuerpos anti-DNAn es muy útil en el diagnóstico de LEG, permitiéndonos evaluar su comportamiento clínico, evolución y pronóstico. Sin embargo, su estudio requiere generalmente de métodos costosos y sofisticados como el RIA o inmunofluorescencia con Crithidia luciliae, en los que se utiliza material radioactivo o equipo de difícil acceso. Por ello, el método de ELISA empleando DNAn constituye una alternativa idónea, que ofrece alta sensibilidad y especificidad para identificar estos anticuerpos anti-DNAn, evitando así la posible interferencia de otros autoanticuerpos.

**OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo fueron:

a) Aplicar una prueba inmunoenzimática (ELISA) en la detección de anticuerpos anti-DNA, en el LEG.

b) Definir si mediante la purificación DNAN se logra evitar la interferencia de otros anticuerpos.

c) Comparar nuestro sistema de ELISA con pruebas tradicionales como la IFI con Crithidia luciliae.

**HIPOTESIS**

Si el inmunoensayo es una prueba altamente específica y sensible, permitirá la detección de anticuerpos anti-DNA en pacientes con LEG, evitando la interacción de otros anticuerpos mediante la purificación del DNAn.

## MATERIAL Y METODOS

### Pacientes

Se estudiaron 61 sueros de pacientes que fueron clasificados como LEG, de acuerdo a los criterios aceptados por el Colegio Americano de Reumatología (anteriormente llamado Asociación Americana de Reumatología (3). Todos ellos presentaron AAN positivos por la prueba de IFI.

La clasificación de las muestras se realizó de acuerdo al patrón de fluorescencia empleando como sustrato células HEp-2, y de acuerdo a la inmunoespecificidad que presentaron mediante el método de Ouchterlony.

### Anticuerpos antinucleares

Para determinar el patrón de tinción de los AAN, los sueros fueron diluidos 1:20 en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.1M, pH 7.2), y se cubrió la laminilla que contenía las monocapas de células HEp-2 (AFT-II System, Behring Calbiochem, La Jolla, Ca. USA). De la misma manera se trataron los controles positivos y negativos. La placa se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente (T.A) por 30 minutos, y en seguida se lavó con PBS por 10 minutos. Después se lavó suavemente con agua fría. Terminando este período, la placa se cubrió con antigamaglobulina humana conjugada con fluoresceína y se incubó por 30 minutos a T.A al abrigo de la luz. Una vez colocada la antigamaglobulina se lavó con PBS y se montó en un cubreobjetos con glicerinafosfato, manteniendo la laminilla en una caja oscura. Por último se examinó el patrón tincional empleando un

microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss).

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

Lineal periférico o anular: Tinción fluorescente característica del borde del núcleo.

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

Homogéneo difuso: Tinción uniforme a través de todo el núcleo.

Nucleolar: Se refiere a la tinción del nucleólo.

Citoplasmático: El citoplasma de cada célula toma una apariencia granular. Puede corresponder a anticuerpos anti-mitocondria, ribosomal o antimúsculo liso (5,6,35,36,37).

#### **Preparación del DNA**

Para separar el DNAn (DNA de doble cadena) del DNAd (DNA de una cadena) se empleó un DNA total altamente polimerizado de timo de ternera tipo V (Sigma, Co.). Para preparar este antígeno se diluyeron 5 mg de DNA de timo de ternera en 4.5 ml de PBS. Además, se adicionaron 0.5 ml de  $\text{NaIO}_4$  previamente diluido en una solución de fosfatos 0.04M pH 6.9, y se colocó en incubación a 37°C manteniendo durante 2 hrs con agitación continua. Terminado este periodo, los 5 ml de la solución se dializaron con agua destilada por 24 hrs con agitación continua.

El tratamiento con 0.02M de  $\text{NaIO}_4$  nos permitió eliminar la posible reactividad de los anticuerpos anti-DNA con las glicoproteínas del antígeno Sm, de acuerdo a publicaciones

previas (46).

#### Purificación del DNAn

Para separar el DNAn del DNAd se uso una columna de intercambio iónico (columna de hidroxilapatita) (47).

La cromatografía se realizó a 60°C, para lo cual se empleó un baño maría durante todo el experimento. La columna se lavó con una solución de fosfatos 0.01M. En seguida se adicionaron 357 µg de DNA total (Sigma Co, USA), previamente diluido en una solución de fosfatos 0.01M. Una vez que se agregó el DNA se lavó repetidamente la columna con la misma solución de fosfatos 0.01M. Posteriormente, se agregaron concentraciones crecientes de fosfatos. Se inició con una concentración de 0.2M de fosfatos para separar el DNAd, recolectando fracciones de 3 ml. Después de que se colectó esta primera fracción, se lavó nuevamente la columna con 7 ml de una solución 0.25M de fosfatos para eliminar el DNAd que pudiera haber quedado atrapado en esta fase de la separación. A continuación se agregó nuevamente la solución de fosfatos incrementado la molaridad (0.4M) para coleccionar el DNAn.

Después de este proceso se coleccionaron los viales conteniendo el DNAd y DNAn, y se lavó la columna con una solución de fosfatos 0.5M para eliminar todo el DNA atrapado. Por último se lavó con una solución de fosfatos 0.01M para dejar lista la hidroxilapatita para un nuevo corrimiento.

A los viales que contenían el DNAd y DNAn cadena se les

realizaron 3 extracciones con 2-butanol. Para ello se adicionaron 500  $\mu$ l de 2-butanol por cada 500  $\mu$ l de DNA, procediendo a centrifugar (12500g por 30 segundos). Este proceso se repitió hasta obtener un volumen aproximado de 100 a 200  $\mu$ l de la solución. En seguida se les agregó dos volúmenes de etanol absoluto y se agitó suavemente colocando este preparado a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 1 hr, o bien a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 hrs.

Una vez obtenidos los precipitados del DNA se centrifugaron los viales por 5 minutos en la microfuga (Beckman) (12500 g), se desechó el sobrenadante, y se recolectó el precipitado resuspendiendo este en PBS (1 ml).

El DNAn separado por la columna de intercambio iónico se colocó en una membrana y se realizó una diálisis por 24 hrs con PBS 0.05M. Al término de este periodo se despegó la muestra del DNAn de la membrana de diálisis con choques eléctricos por las diferentes superficies de la bolsa de 50 volts en una cámara submarina, empleando una solución amortiguadora de TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.1M. En seguida se colectó la muestraaaaa previa homogenización. Por último la muestra fue leída a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro para determinar su concentración y grado de pureza (47).

#### Anticuerpos anti-DNA nativo (DNAn)

Los anticuerpos anti-DNAn fueron estudiados por el ensayo de IFI, usando preparaciones de Crithidia luciliae. Para la determinación de estos anticuerpos se usaron laminillas conteniendo Crithidia luciliae como sustrato (AFT-III System Behring Calbiochem, La Jolla, Ca. USA). Las

muestras de los pacientes fueron incubadas a T.A en una dilución 1:20. El exceso del suero fue removido por lavado con PBS, agregando después gamaglobulina antihumana IgG, después de lo cual se lavó nuevamente y se observó al microscopio de epifluorescencia.

La tinción fluorescente del cinetoplasto solo ó del cinetoplasto y del núcleo nos indicó una reacción positiva, mientras que la tinción fluorescente en el núcleo, pero no en el cinetoplasto, nos indicó una reacción negativa (10,17,20,38,39,40,41,42,43).

#### Imunodifusión (Ouchterlony).

Los anticuerpos contra los antígenos extraíbles del núcleo (ENA) se estudiaron por doble inmunodifusión (Ouchterlony). Los anticuerpos contra Sm, RNP, SSA(Ro), SSB(La), Scl-70 fueron detectados por este método, mediante sueros prototipos monoespecíficos. (ENA-I, II,III Behring, Calbiochem, La Jolla, Ca. USA).

La solución que contiene la fuente de los ENA (timo de ternera) se colocó en el pozo central en la placa de agarosa, mientras que las muestras de los pacientes y controles se colocaron en los pozos periféricos.

La fuente de los ENA se reconstituyó con 0.45 ml de agua destilada, y en seguida se prepararon las diluciones 1:2 y 1:4 de los sueros. En seguida se colocaron en los pozos respectivos, empleando siempre controles positivos para establecer la presencia de las reacciones de identidad inmunoquímica (29,30,44,45).

### ELISA para anticuerpos anti-DNAN

Los anticuerpos anti-DNAN se estudiaron por la técnica de ELISA. Se usaron placas de poliestireno (Nunc), las cuales fueron cubiertas con albúmina bovina metilada diluida en agua deionizada a una concentración de 1 mg/ml por 24 hrs a 4°C. Al terminar este periodo se lavó nuevamente 5 veces con PBS-Tween-20 al 0.05%, adicionando en seguida 100 µl por pozo del DNAN tratado con NaIO<sup>4</sup> a una parte de la placa y 100 µl del DNA total tratado con NaIO<sup>4</sup> a la parte restante de la placa, a una concentración de 10 µg/ml respectivamente. Se incubó la placa 3 hrs a T.A, y se lavó nuevamente 5 veces con PBS-Tween-20 al 0.05%. Después de que se lavó con PBS-Tween-20 al 0.05% en seguida se dejó bloqueando con albúmina bovina fracción V (Sigma, Co) al 1% en PBS-Tween-20 al 0.05% durante 24 hrs. Después se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween-20 al 0.05% los sueros fueron diluidos 1:100 en PBS-Tween y se colocaron en sus respectivos pozos. La placa se incubó 30 minutos a 37°C; en seguida se lavó 5 veces con PBS-Tween-20 al 0.05%, adicionando anti-IgG marcada con peroxidasa (Sigma, Co. USA) a una dilución de 1:10000 en PBS-Tween. La placa se incubó por 30 minutos a 37°C y se usó una solución reveladora conteniendo ortofenilendiamina (OFD) a una concentración de 4mg/10ml en amortiguador de citratos (0.1M, pH5.0) y 5 µl de peróxido de hidrógeno. Por último se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro de placas de ELISA a 492 nm (30,48,49,50).

### Anticuerpos anticardiolipina

Los anticuerpos anticardiolipina fueron estudiados por la técnica de ELISA. Se usaron placas de poliestireno (Nunc), las cuales fueron sensibilizadas con 200  $\mu$ l de cardiolipina (5 mg/ml Sigma, Co) diluida en metanol absoluto. Para bloquear estas placas se adicionaron 100  $\mu$ l de PBS con suero fetal de ternera al 10 % incubando por 2 hrs a T.A. Posteriormente se lavó la placa con 200  $\mu$ l de PBS sin Tween-20 y se colocaron 100  $\mu$ l de suero diluido 1:50 en PBS-SFT al 10% incubando a 37°C durante 1 hr. A continuación se lavó la placa 5 veces con PBS y se adicionaron 100  $\mu$ l del anticuerpo marcado con peroxidasa a una dilución de 1:8000 para IgG y de 1:10000 para IgM en PBS con suero de ternera fetal (SFT) (Sigma, Co) al 10%. Después de incubar la placa a 37°C por 1 hr, se lavó nuevamente 5 veces con PBS, y se adicionaron 100  $\mu$ l de la solución reveladora conteniendo 4mg de OFD, 5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% y 10 ml de amortiguador de citratos a cada pozo incubando por 10 minutos a T.A. Por último se agregaron 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2.5 N para detener la reacción. La lectura de la D.O. de la placa se realizó a 492nm usando como blanco agua destilada.

Los valores de referencia fueron obtenidos mediante el estudio de 84 sueros de controles clínicamente sanos, captados de donadores del banco de sangre. La expresión de nuestros resultados se realizó en unidades GPL y MPL, las cuales fueron obtenidas mediante la siguiente fórmula:

**Factor de conversión:**

**=Concentración del calibrador de cardioplipina**

Valor de absorción del calibrador (D.O.)

Concentración de anticuerpos anticardioplipina en suero:

Factor de conversión x absorbancia de la muestra

Los niveles de GPL y MPL que correspondió a la media más 2 D.E. de los sueros controles, fueron considerados como nuestro valor de corte para considerar negativos a esta prueba (GPL <21, MPL <10). Los calibradores para los anticuerpos anticardioplipina de clase IgG e IgM fueron obtenidos de un equipo comercial (Reaads, Westminster, USA) (38).

#### **Análisis de Resultados**

El cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos fue determinada mediante su lectura en un espectrofotómetro a 260 nm. Con esta técnica se ha reportado que una lectura de 1.0 de D.O. corresponde a 50 µg/ml de DNAN y 40 µg/ml de DNAd.

Para establecer la pureza de nuestro preparado se determinó la relación de las lecturas a 260 y 280 nm, donde la relación para aceptar un grado de pureza adecuado es la siguiente:

Relación 260/280 nm

1.8 para DNA.

Los cálculos se realizaron mediante un programa estadístico, que ha sido utilizado especialmente para evaluar parámetros biomédicos (Epistat).

**Evaluación de las técnicas de Crithidia luciliae y ELISA**

La evaluación de la utilidad del ELISA como método de determinación para anticuerpos anti-DNAN se realizó mediante la medición de los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad y eficiencia, así como valor predictivo positivo y negativo.

**Sensibilidad.** Esta es definida como la habilidad de la prueba para identificar correctamente a todos los pacientes enfermos.

$$\text{sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

**Especificidad.** Este parámetro es definido como la habilidad de la prueba para identificar correctamente a todos los pacientes no enfermos.

$$\text{especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

**Eficiencia.** Esta medida indica el porcentaje de pacientes correctamente clasificados por la prueba (enfermos y no enfermos).

$$\text{eficiencia} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{(\text{VP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{VN})} \times 100$$

Valor predictivo positivo. Es la medida que estima que tan frecuentemente la prueba es correcta cuando el resultado es positivo.

$$\text{valor predictivo positivo} = \frac{\text{VP+FP}}{\text{VP}}$$

Valor predictivo negativo. Este valor indica que tan a menudo la prueba es incorrecta cuando el resultado es negativo.

$$\text{valor predictivo negativo} = \frac{\text{FN+VN}}{\text{VN}}$$

Donde:

VP = Verdadero positivo

VN = Verdadero negativo

FN = Falso negativo

FP = Falso positivo

**RESULTADOS****Anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta**

Se estudiaron 61 sueros con AAN positivos mediante la prueba de IFI, empleando células HEP-2.

De acuerdo a la fluorescencia se contaron con sueros que presentaron diferente tipo de patrón, los cuales se describen en la tabla No. 1. Al analizar la totalidad de los sueros, incluyendo aquellos con uno ó 2 tipos de patrones tincionales se encontró que el mayor porcentaje correspondió a los sueros que presentaron un patrón moteado (M), siguiendole en orden de frecuencia aquellos que mostraron un patrón homogéneo difuso (HD) y un patrón lineal periférico (LP). Los patrones nucleolar (N) y citoplásmico (C) ocurrieron con menor frecuencia. Veintidos de los 61 sueros presentaron al menos 2 tipos de patrones. Estos sueros incluyeron a 11 con tinción HD y LP, 7 con fluorescencia LP y M, 2 con fluorescencia HD y M, uno con patrón M y N y uno con patrón M y C. Al evaluar cuidadosamente los sueros con patrón HD y LP apreciamos que la suma de estos sueros superó los resultados de los pacientes con patrón M, encontrando un total de 26 con tinción HD, 24 con fluorescencia LP y 30 con patrón moteado. Solo 19 sueros eran moteados puros, pero esta cifra se incrementó al considerar a las muestras con las tinciones combinadas, LP y moteado, y HD y moteado.

TABLA No. 1. PATRONES TINCIONALES DE LOS AAN POR LA TECNICA  
DE IFI

TIPO DE FLUORESCENCIA	n	SUEROS	%
Moteado	30		49.18
H. Difuso	26		42.62
L. Periférico	24		39.34
Nucleolar	2		3.27
Citoplásmico	1		1.63
2 patrones	22**		36.06

n=61\*

\* Los totales no suman 61, pues los patrones de fluorescencia se analizan por separado

\*\* 11 muestras con HD y LP, 7 con LP y M, 2 con HD y M, 1 con M y N, y una con M y C

**Inmunoespecificidad de los anticuerpos antinucleares**

Al estudiar la inmunoespecificidad por los métodos de IFI con monocapas de Crithidia luciliae y mediante Ouchterlony se encontró que el mayor porcentaje correspondió a los sueros con anticuerpos anti-DNAn, en seguida estuvieron los sueros con anticuerpos anti-RNP, y Sm. Finalmente solo hubo dos muestras con la combinación de estos 2 anticuerpos, anti Sm y RNP, y otros 2 con anticuerpos anti-SSA(Ro). En 8 casos de los 61 no se demostró especificidad para anticuerpos anti-DNAn y anti-ENA. Estos resultados se describen en la tabla No. 2.

TABLA No.2. INMUNOESPECIFICIDAD DE LOS AAN POR IFI Y OUCHTERLONY

ESPECIFICIDAD

INMUNOQUIMICA	n	% SUEROS
DNAn*	30	49.18
RNP**	11	18.03
Sm**	4	6.55
Sm/RNP**	2	3.27
SSA**	1	1.63
SSA/DNAN ** y *	1	1.63
DNAn/Sm * y **	4	6.55
SIN ESPECIFICIDAD	8	13.11

n=61

\*IFI (Crithidia luciliae)

\*\* Ouchterlony

**Relación de los anticuerpos antinucleares por fluorescencia con la especificidad inmunoquímica**

Cuando relacionamos el patrón de fluorescencia con células HEP-2, con el resultado de la inmunoespecificidad apreciamos que la mayoría de los sueros con patrones homogéneo difuso y lineal periférico presentaban anticuerpos anti-DNA<sub>n</sub> (44.26%) y que las muestras con patrón moteado presentaron frecuentemente anticuerpos anti-ENA (27.8%), incluyendo sueros con anticuerpos anti-Sm, RNP, Sm/RNP y SSA (RO). Estos datos se muestran en la tabla No. 3.

**TABLA No. 3. RELACION DE LOS AAN POR FLUORESCENCIA CON LA ESPECIFICIDAD INMUNOQUIMICA**

PATRON (Células HEP-2)	ESPECIFICIDAD ‡				
	DNA <sub>n</sub>	Sm	RNP	Sm/RNP	SSA
H. Difuso	31.1	1.6	3.2	-	-
L. Periférico	27.8	8.1	6.5	1.6	1.6
Moteado	16.3	8.1	13.1	3.2	1.6
Nucleolar	3.2	-	-	-	-
Citoplásmico	-	-	1.6	-	-
2 patrones	21.3*	4.9**	8.1***	-	1.6****

\* 9 muestras con patrón HD y LP, 3 LP y M, y una M y N.

\*\* 2 muestras con patrón LP y M, y una con LP y HD.

\*\*\* 2 muestras con tinción LP y M, 2 HD y LP y una M y C.

\*\*\*\* Un caso con fluorescencia LP y M.

### Purificación del DNA

El empleo de un procedimiento de intercambio iónico, empleando una columna de hidroxilapatita y una fuente de DNA total comercial altamente polimerizado, nos permitió contar no sólo con un ácido nucléico ideal para nuestro sistema de ELISA, sino que nos facilitó la separación adecuada entre el DNAn y DNAd.

Mediante esta metodología fué posible distinguir 2 picos de separación al utilizar diferentes concentraciones de una solución de fosfatos. Una vez que aplicamos el DNA total a la columna de cromatografía observamos una clara distinción entre las diferentes formas del DNA (figura No. 1).

Al usar un gradiente creciente de concentración de fosfatos, encontramos que las fracciones conteniendo el DNAd aparecía al emplear 0.2M de fosfato de sodio, mientras que la concentración ideal para separar el pico del DNAn fue de 0.4M de fosfato de sodio.

En la tabla No. 4 se anotan las lecturas representativas del procedimiento de separación del DNA, apreciando las diferentes fracciones obtenidas mediante esta técnica. De estos picos de separación, destacan los correspondientes al DNAn, por su alta lectura respecto al contenido de la fuente original de este ácido nucléico.

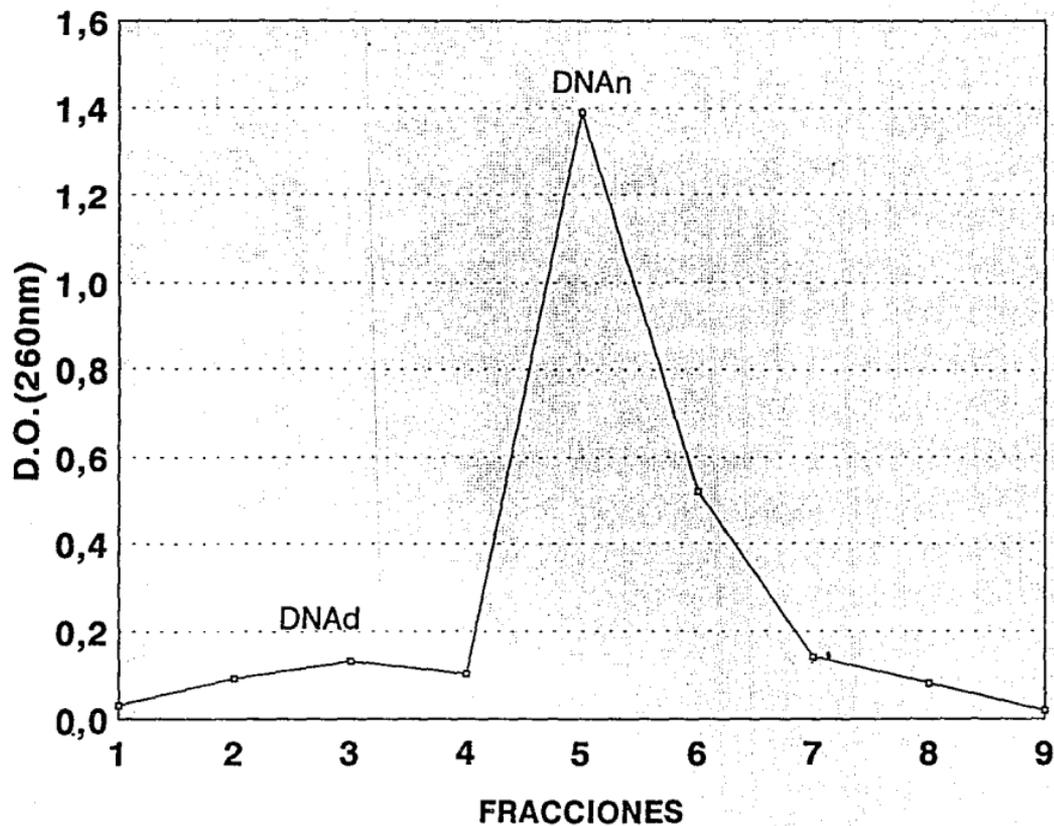
TABLA No. 4. GRADIENTE DE CONCENTRACION DE FOSFATOS  
PARA SEPARAR EL DNAn DE DNAd

Fracciones	Fosfatos (Molaridad)	ABSORBANCIA (nm)	
		260	280
		D.O.	
		2.03*	1.85*
1	0.05	0.03	0.05
2	0.1	0.09	0.04
3	0.2	0.13	0.06
4	0.3	0.10	0.08
5	0.4	1.39	0.76
6	0.5	0.52	0.32
7	0.6	0.14	0.10
8	0.7	0.08	0.05
9	0.8	0.02	0.01

\* lecturas del DNA total

Una vez que se obtuvieron las concentraciones con las cuales se logró separar eficientemente el DNAn del DNAd, se realizaron varias corridas para obtener suficiente DNAn para nuestro estudio.

FIGURA 1. GRADIENTE DE SEPARACION DEL DNA



Las fracciones de DNAn mostraron lecturas adecuadas (260 y 280) nm para ser empleadas en nuestro ELISA, como puede apreciarse en la tabla No. 5.

TABLA No. 5. LECTURAS DEL DNA PURIFICADO PARA SU USO EN LA TECNICA DE ELISA

FRACCION	LECTURA		PUREZA 260/280	CONCENTRACION µg/ml
	260 nm	280nm		
	D.O.			
DNAn	0.837	0.495	1.69	41.85
	0.802	0.472	1.69	40.1
DNAd	0.224	0.145	1.54	8.26
	0.089	0.077	1.15	3.08

#### Anticuerpos antinucleares por ELISA

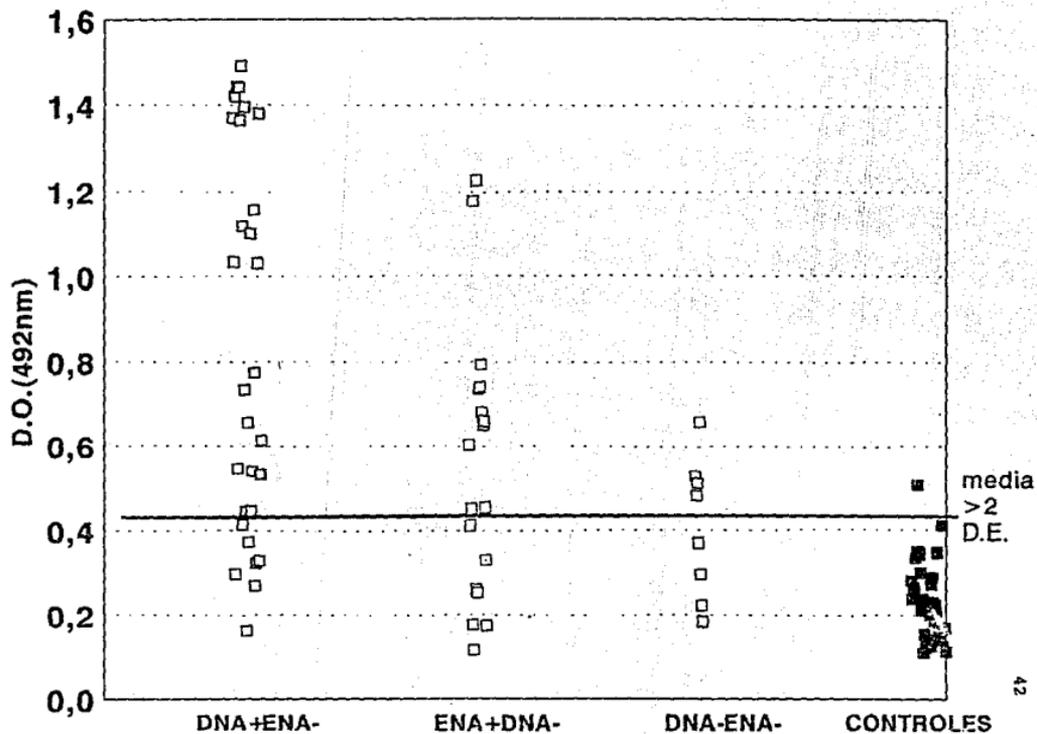
Para fines de este trabajo el límite de corte para establecer la positividad de los anticuerpos anti-DNAn fue obtenido estudiando 34 muestras de sueros de donadores sanos. Se consideró que una prueba positiva fue aquella en la que la D.O. superaba la media más 2 D.E. de los testigos.

Los 61 sueros de los pacientes con LEG, con AAN positivos por IFI fueron estudiados por el método de ELISA. Veinticinco de los 35 sueros positivos por Crithidia luciliae, incluyendo 30 con anticuerpos anti-DNAn solo y 5

con anticuerpos anti-DNAn y Sm o SSA(Ro) (Tabla No.2) fueron positivos por el método de ELISA (71.4%), cuando empleamos DNAn (Figura No. 2). En cambio 24 de estas 35 muestras positivas por Crithidia luciliae fueron positivas por ELISA (68,5%) cuando empleamos DNA total tratado con NaIO<sub>4</sub>. El 57.6% (15/26) y 53.8% (14/26) de los sueros con pruebas de Crithidia luciliae negativos incluyendo 18 con anticuerpos anti-ENA y 8 sin ningún otro tipo de especificidad (DNAn y ENA) (Tabla No. 2) resultaron positivos por ELISA usando DNAn y DNA total tratado con NaIO<sub>4</sub>. Al analizar los resultados de acuerdo a las densidades ópticas se observó que las lecturas de los sueros positivos variaron entre 0.428 y 1.77 (492). En contraste, esta densidad óptica fue de 0.1175 a 0.4150 en los sueros negativos.

Los 18 sueros con anticuerpos anti-ENA también fueron estudiados por ELISA. Estos se distribuyeron de la siguiente manera: Once muestras presentaron anticuerpos anti-RNP, 4 anti-Sm, uno anti-SSA, y 2 presentaron la combinación Sm/RNP (Tabla No. 2). Ninguna de estas muestras presentaron anticuerpos anti-DNAn mediante la técnica de IFI con Crithidia luciliae. En contraste 11 de estos 18 (61.1%) sueros anti-ENA positivos fueron positivos al usar DNAn y DNA total tratado con NaIO<sub>4</sub> respectivamente. Cuatro de los 8 sueros en los que no se detecto ninguna especificidad, por IFI y Ouchterlony resultaron anti-DNAn positivos por ELISA, con ambos tipos de antígenos. Estos datos se comparan en la tabla No. 6.

FIGURA 2. ANTICUERPOS ANTI-DNA POR ELISA



La correlación de los resultados del ELISA para los 2 tipos de DNA tomando en cuenta la totalidad de las muestras fue de  $r=0.98$  (r de correlación). Los resultados positivos del total de los sueros con anti-DNA<sub>n</sub> positivos por ELISA independientemente de su resultado por IFI, expresados en D.O. variaron entre 0.428 y 1.487 (Figura No. 2).

TABLA No. 6. ANTICUERPOS ANTI-DNA<sub>n</sub> EN SUEROS ANTI-ENA POSITIVOS

ENA positivos	anti-DNA <sub>n</sub> (Ouchterlony)	anti-DNA <sub>n</sub> * (ELISA)	anti-DNA <sub>n</sub> ** (ELISA)
Sm (n=4)	0	3	3
RNP (n=11)	0	6	5
Sm/RNP (n=2)	0	2	2
SSA (n=1)	0	0	1
Sin especificidad (n=8)	0	4	4
TOTAL (n=26)	0	15	15

\*ELISA con DNA<sub>n</sub>

\*\*ELISA con DNA total

Al estimar la sensibilidad y especificidad de nuestro método de ELISA, tomando como punto de comparación la técnica de Crithidia luciliae, nos dió los resultados presentados en la tabla No.7.

TABLA No. 7. EVALUACION DE LA TECNICA DE ELISA PARA ANTICUERPOS ANTI-DNAN

	DNA puro	DNA + NaIO <sub>4</sub>
Sensibilidad	71.4%	68.5%
Especificidad	42.3%	53.8%
Eficiencia	59.0%	59.0%
Valor predictivo positivo	1.6	1.58
Valor predictivo negativo	1.90	1.91

#### Anticuerpos anticardioplipina

Veintiuno de los 61 sueros con AAN positivos fueron seleccionados para realizarles anticuerpos anticardioplipina, y así estudiar la posible reacción cruzada con este tipo de fosfolípidos. Al determinar los anticuerpos anticardioplipina simultaneamente con los anticuerpos anti-DNAN por la técnica de ELISA se encontró que solo una pequeña parte de los sueros anti-DNAN positivos por Crithidia luciliae y ELISA presentaron valores positivos a anticuerpos anticardioplipina.

Los resultados de este estudio se anotan en las tablas No. 8 y 9, en las cuales se observa que 11 de los 21 sueros con LEG, incluyendo 9 con anticuerpos anti-DNA y 12 con anticuerpos anti-ENA, presentaron anticuerpos anticardiolipina, predominando los sueros con anticuerpos de clase IgG (GPL) (8 de 21) y menos frecuentemente los de clase IgM (MPL) (7 de 21).

TABLA No. 8. ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA EN SUEROS  
ANTI-DNAN POSITIVOS

Sueros positivos Anti-DNAN <u>(C. luciliae)</u>	Anti-DNAN* (ELISA D.O.)	Anticardiolipina GPL**      MPL**	
1	1.03(pos)	15.51	7.87
2	1.42(pos)	32.07(pos)	20.50(pos)
3	1.44(pos)	26.50(pos)	25.55(pos)
4	1.44(pos)	18.82	5.94
5	1.36(pos)	20.00	5.54
6	1.49(pos)	16.36	22.79(pos)
7	0.73(pos)	19.72	23.51(pos)
8	0.77(pos)	40.66(pos)	13.01(pos)
9	1.03(pos)	14.73	23.65(pos)
Valores de referencia	0.426	<21	<10
*ELISA con DNA purificado		**Unidades GPL y MPL	

TABLA No. 9. ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA EN SUEROS  
ANTI-ENA POSITIVOS

Sueros positivos Sm, RNP, SSA (Ouchterlony)	Anti-DNAn	Anticardiolipina	
	ELISA D.O)*	GPL**	MPL**
1	0.41	27.23(pos)	10.55(pos)
2	0.44(pos)	21.81(pos)	6.47
3	0.17	14.23	5.54
4	0.11	12.44	7.76
5	0.26	21.53(pos)	5.11
6	0.25	16.56	9.37
7	0.73(pos)	14.15	5.97
8	0.65(pos)	32.98(pos)	6.97
9	0.65(pos)	27.23(pos)	9.05
10	0.45(pos)	15.41	7.37
11	0.33	12.19	7.33
12	0.17	12.80	7.87

Valores de  
referencia <0.426 <21 <10

\*ELISA con DNA purificado

\*\* Unidades GPL y MPL

## DISCUSION

El LEG es una de las ETC (Enfermedades del tejido conectivo) que se caracteriza por presentar una diversidad de anormalidades inmunológicas, dentro de ellas se han detectado múltiples autoanticuerpos, destacando los que reaccionan con diversos componentes del núcleo y que han sido denominados genéricamente como AAN.

Desde el inicio del estudio de estos AAN se apreció la necesidad de contar con métodos inmunológicos que aportaran la información más adecuada al clínico para realizar un diagnóstico preciso y facilitar el mejor manejo de los pacientes.

La determinación de los AAN por la técnica de IFI fué realizada por vez primera en 1957 (53) y continúa siendo una de las más utilizadas, como prueba inicial para detectar estos marcadores serológicos y establecer los patrones tincionales que puedan orientar sobre el tipo de autoanticuerpos que presentan los pacientes con LEG.

En la literatura se describe que el patrón de los AAN por IFI en el LEG es comúnmente homogéneo difuso (HD) o lineal periférico (LP), el primero se debe a anticuerpos dirigidos como desoxiribonucleoproteínas, histonas y ocasionalmente DNAn. En cambio el LP resulta típicamente de la presencia de anticuerpos contra el DNAn, menos frecuente DNAd y desoxiribonucleoproteínas o histonas (4,53). Los hallazgos de nuestro trabajo coincidieron con estas observaciones ya que la mayoría de los enfermos con LEG

presentaron uno de estos dos tipos de fluorescencia, predominando el patrón HD(42.6%). Interesantemente, 7 casos con patrón LP tenían también el patrón moteado, por lo que la suma total de los sueros con esta última tinción se incrementó de 19 a 30 (31.1% a 49.1%), superando las cifras de los sueros con patrones HD y LP. También encontramos que tanto los AAN con patrón homogéneo difuso, como los AAN con tinción lineal periférica se correlacionaron con la presencia de anticuerpos anti-DNAn.

En cuanto al patrón moteado se ha reportado que este tipo de inmunofluorescencia ocurre en pacientes con LEG, y que esta alteración se asocia con anticuerpos contra una diversidad de antígenos extraíbles del núcleo como ribonucleoproteínas. Nosotros encontramos que una parte de nuestras muestras, presentó este tipo de tinción y que la mayoría se encontraba relacionados con la presencia de anticuerpos anti Sm y RNP (4). El patrón nucleolar es poco común en el LEG y puede deberse a anticuerpos contra el RNA, los cuales se observan generalmente en pacientes con fenómeno de Raynaud o esclerodermia. La combinación de 2 o más tipos de fluorescencia, han sido reportados en el LEG (16). Nosotros apreciamos un grupo de pacientes con estas alteraciones, que interesantemente constituyó un tercio de los casos del grupo total, predominando los anticuerpos que presentaban la combinación de los patrones homogéneo difuso y lineal periférico y con tinción lineal periférico y moteada.

A partir de la descripción de los AAN por inmunofluorescencia en el LEG, se ha demostrado que estas inmunoglobulinas son marcadores importantes en el diagnóstico de este padecimiento, al grado que se han incluido dentro de los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (3) (anteriormente llamado Asociación Americana de Reumatología), e insistentemente se describe la relación de estos autoanticuerpos con algunas manifestaciones clínicas, grado de actividad de la enfermedad y aún con el pronóstico de estos pacientes (16), sin embargo, los AAN pueden ocurrir en otras enfermedades, que no necesariamente tienen un fondo autoinmune y que deben ser considerados en el diagnóstico diferencial. Así se ha observado que los AAN por inmunofluorescencia indirecta no sólo se encuentran en el LEG sino en una gran variedad de condiciones como la artritis reumatoide y otros padecimientos inflamatorios crónicos, así como en la terapia con ciertos medicamentos, y algunas infecciones como la endocarditis bacteriana subaguda. También pueden aparecer asociados con ciertas enfermedades hepáticas, notablemente la hepatitis crónica activa y la cirrosis biliar primaria.

El avance en el conocimiento de las alteraciones inmunes en el LEG y la implementación de diferentes técnicas de laboratorio para detectar estos cambios, no solo ha permitido la detección de los AAN, sino el estudio de la especificidad inmunoquímica de estos marcadores. Los AAN más importantes en el LEG, son los anticuerpos dirigidos contra

algunos componentes particulares del núcleo, como el DNAN y diversas proteínas acidicas no histonas o ribonucleoproteína como el Sm, RNP, SSA (Ro), algunas de las cuales se han considerado específicos de esta enfermedad (16,51,54).

Los anticuerpos anti-DNA se han dividido en aquellos, que reconocen el DNAN, los cuales son practicamente exclusivos de los pacientes con LEG, especialmente cuando son de alta afinidad, y los anticuerpos que tienen avidéz por el DNA de una cadena o desnaturalizado (DNAd) y que aparecen en una gran variedad de enfermedades reumáticas, mostrando además baja afinidad por su antígeno.

Los anticuerpos anti-DNA pueden estar dirigidos contra epitopes únicos o compartidos en una ó las dos cadenas de la estructura del ácido nucléico y actualmente se cuenta con una gran variedad de métodos de laboratorio con diferente sensibilidad y especificidad que permiten estudiar este tipo de alteraciones inmunológicas y específicamente los anticuerpos anti-DNA. En el laboratorio clínico se emplean generalmente técnicas de alta sensibilidad y especificidad para determinar los anticuerpos anti-DNAN como el radioinmunoensayo (Farr) ó el método de inmunofluorescencia indirecta con Crithidia luciliae. En el ensayo de Farr, la separación del DNA fijado a los anticuerpos, del DNA libre ocurre por precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio saturado al 50% en la que todo el DNA radioactivo fijado se precipita con sus anticuerpos respectivos, mientras que el DNA libre permanece en el sobrenadante.

(4,16). En cambio, la detección con Crithidia luciliae tiene su base en que este hemoflagelado tiene un cinetoplasto que contiene DNA de dos cadenas que esta asociado con histonas, por lo que los anticuerpo se unen al cinetoplasto y estos se detecta indirectamente con un suero antiglobulina humana marcado con fluoresceína. Las características de estos y otros ensayos han permitido detectar algunas de las diferencias de los anticuerpos anti-DNA<sub>n</sub> como su grado de avidéz, el isotipo de estas inmunoglobulinas y su posible reacción cruzada. Adicionalmente han logrado favorecer el estudio específico de estos marcadores y su relación con mecanismos patogénicos, evolución y pronóstico de la enfermedad, y su utilidad en el tratamiento.

Nosotros estudiamos la presencia de anticuerpos anti-DNA<sub>n</sub> por el método de IFI usando Crithidia luciliae, que tiene la ventaja de no requerir material radioactivo (Farr). Con esta técnica encontramos que más de la mitad de los sueros fueron positivos contra este ácido nucléico y constituyó nuestro punto de partida para evaluar el sistema de ELISA.

Por otro lado, los anticuerpos contra ribonucleoproteínas fueron detectados inicialmente en 1966, mediante técnicas simples de inmunodifusión, apreciando una banda de precipitación que mostraba identidad con sueros monoespecíficos anti-S<sub>m</sub>, RNP<sub>n</sub>, SSA(Ro) y SSB(La). Más adelante se ha contado con técnicas inmunoenzimáticas, de inmunotransferencia y aún con proteínas recombinantes, cuya

mayor sensibilidad y especificidad tiene la ventaja de detectar anticuerpos no precipitantes y cuantificar este tipo de respuesta inmunológica (54).

En este estudio se realizó una primera fase, en la que además de emplear el método IFI con Crithidia luciliae contamos con el método de Ouchterlony para determinar la inmunoespecificidad de nuestras muestras. Una vez que identificamos este tipo de AAN, aplicamos un sistema de ELISA en el cual se empleó DNA total altamente polimerizado y DNAn unido a la fase solida mediante una interfase de albúmina metilada. Con estas técnicas de IFI e inmunodifusión observamos que la mayoría de los sueros presentaban anticuerpos anti-DNAn, que reaccionaban con el cinetoplasto de Crithidia luciliae y en menor cantidad se encontraban los anticuerpos precipitantes que presentaban bandas de identidad con sueros monoespecificos anti-RNP, anti-Sm, y anti-SSA (Ro). Al estudiar estos sueros por ELISA la mayoría de los pacientes con anticuerpos anti-DNAn por Crithidia luciliae fueron positivos en el sistema enzimático con DNAn total y DNAn. En comparación al estudio de inmunofluorescencia más de la mitad de los sueros negativos por Crithidia luciliae resultaron con anticuerpos anti-DNAn positivos por ELISA. Además de esta ventaja que aportó mayor sensibilidad, logramos tener una prueba cuantitativa, ya que los sueros positivos variaron entre títulos superiores a la media más 2 DE, hasta cifras superiores de la media más 13 DE.

Las principales diferencias en las técnicas de laboratorio que detectan los anticuerpos anti-DNA ocurren entre aquellos métodos de fase sólida, como el ELISA, y las pruebas en fase fluida como el Farr, precipitación con PEG (poli etilen glicol), métodos de filtración e inmunofluorescencia, puesto que los primeros son altamente sensibles y los últimos detectan principalmente anticuerpos de alta especificidad. Además, la variación en los métodos de detección por laboratorio de los anticuerpos anti-DNA puede depender de otros factores. Los anticuerpos anti-DNA en el LEG pueden ser tanto de la clase IgG que fue el isotipo que detectamos en las pruebas de IFI y ELISA, o bien de tipo como IgM, y menos frecuentemente se han descrito anticuerpos de tipo IgA, IgE e IgD cuyo estudio no fue posible realizar en este trabajo.

Por otra parte los títulos y clase de los anticuerpos anti-DNA pueden fluctuar en relación con las manifestaciones inflamatorias, especialmente con el grado de nefritis (16). Nosotros estudiamos la presencia de AAN sin hacer un análisis longitudinal de la variación de sus títulos o del cambio del isotipo, sino que analizamos solo los anticuerpos de la clase IgG, cuya determinación es uno de los procedimientos más importantes por su asociación con el daño tisular en el LEG.

La detección de anticuerpos anti-DNA por ELISA se ha realizado mediante diversos tipos de ensayos. En algunos de ellos el antígeno se adosa directamente a un soporte de fase

sólida. Estos antígenos se pueden unir covalentemente a diferente tipo de material particulado, como celulosa y poliacrilamida, y también se puede obtener una adsorción pasiva satisfactoria a tubos, perlas, discos o microplacas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno. La sensibilización del DNA se puede lograr mediante la incubación directa de una fuente de este antígeno a la superficie sólida, sin embargo la mayoría de los autores han optado por el uso de una interfase para facilitar la unión del antígeno a una superficie que presenta la misma carga eléctrica que el DNA (49). La protamina, L-lisina o albúmina metilada han sido útiles para este fin, al favorecer la unión del DNA al poliestireno. Nosotros empleamos solo un método de sensibilización con la interfase de albúmina metilada, puesto que este último ha mostrado ventajas sobre la protamina y L-lisina al facilitar la unión del DNA, y evitar la interferencia de otros anticuerpos dirigidos contra nucleohistonas (48). En la práctica clínica los anticuerpos anti-DNA frecuentemente coexisten con anticuerpos anti-histonas, por lo cual la implementación de una técnica que delimite esta función y que evite esta reacción cruzada en los sueros de los pacientes con LEG, merece especial interés. Por otra parte, la relación entre la actividad anti-histonas y la unión a protamina y L-lisina, sugieren que los anticuerpos anti-histona tienen una gran habilidad para unirse a proteínas aniónicas.

Las diferencias que se han apreciado al emplear

albúmina metilada han sido que al usar la interfase se evitó la interferencia de otros anticuerpos como son los anti-histonas, y se logró una mejor unión de los anticuerpos anti-DNA, ya que al utilizar la sensibilización directa a la placa de poliestireno, se puede encontrar unión inespecífica de anticuerpos contra el DNA, los cuales reaccionan muy fácilmente a la placa de poliestireno (41,48).

Otro hallazgo notable cuando se emplean métodos de alta sensibilidad, como el ELISA y se estudian autoanticuerpos en pacientes con LEG, es su posible reactividad cruzada con otros antígenos. Esta observación de reacciones cruzadas de los AAN en el LEG, no solo ocurre en la práctica clínica, sino que ha sido estudiada cuidadosamente a partir de anticuerpos monoclonales anti-DNA, permitiendo agrupar a los antígenos potenciales de reacción cruzada en los siguientes: Polinucleótidos, fosfolípidos, proteoglicanos y otros grupos polianiónicos; diversas proteínas celulares que puedan estar contenidas en el núcleo, citoplasma y membrana (como vimentina y queratina) y finalmente en un grupo misceláneo donde se incluyen a la IgG, distintas proteínas solubles, haptenos y antígenos bacterianos (16).

Algunas de estas reacciones cruzadas son probablemente debidas a la estructura polianiónica del DNA, la cual puede interactuar con moléculas protéicas cargadas positivamente (catiónicas), especialmente cuando se usa una alta concentración de DNA en las placas de ELISA, o bien cuando

se emplea la interfase con albúmina metilada. Esto puede explicar que nuestros valores basales de las muestras en los pozos sensibilizados con este tipo de albúmina, fueron ligeramente superiores a las lecturas de los pozos no sensibilizados. En apoyo a esta observación los anticuerpos anti-DNA pueden mostrar reacciones cruzadas con fosfolípidos que tienen cargas netas negativas como la cardiolipina y con moléculas con grupos aniónicos repetitivos, como el dextrán sulfato y heparán sulfato (54). Nosotros realizamos la determinación simultánea de anticuerpos anti-DNA y anticardiolipina y observamos que solo una pequeña parte de los sueros anti-DNA positivos por Crithidia luciliae y ELISA mostraron lecturas positivas para este sistema de anticuerpos contra fosfolípidos, lo que excluye razonablemente que nuestro método de ELISA para anticuerpos anti-DNA pueda detectar una reacción cruzada con estos antígenos. Otro dato de interés, es que las diferencias que obtuvimos al comparar DNA con el DNA total fueron mínimas encontrando cifras semejantes en cuanto a sensibilidad y especificidad. Esto puede deberse a que el DNA que empleamos correspondió a una fuente comercial de este antígeno altamente polimerizado, que mostró mayor contenido de DNA en la cromatografía de intercambio iónico.

Otro dato interesante por el que se requiere de métodos de laboratorio fidedignos para el estudio de la especificidad inmunoquímica es la coincidencia de anticuerpos anti-DNA con otros marcadores que reconocen

distintos epítopes nucleares en el LEG. La asociación de anticuerpos anti-DNAn con anti-Sm, RNP, SSA (Ro), SSB (La) ha sido reportada por varios autores (16,54). Nosotros encontramos previamente que el 16% de los sueros de pacientes con LEG presentaban dos o más de estos autoanticuerpos, predominando la relación de los anticuerpos anti-DNAn (detectados por el método de Crithidia luciliae) con anticuerpos anti-Sm (determinados por la técnica de Ouchterlony). En este estudio encontramos 5 sueros que mostraron anticuerpos anti-DNA con anti-Sm ó RNP por las técnicas de inmunofluorescencia y Ouchterlony. Por ello en nuestro sistema de ELISA para anticuerpos anti-DNA empleamos inicialmente el tratamiento con NaIO<sub>4</sub> para eliminar la reactividad con anticuerpos anti-Sm (46) y además separamos el DNAn del DNAd, a fin de contar con una prueba específica contra el DNAn.

Con esta metodología no solo apreciamos que la mayoría de los sueros con anticuerpos anti-DNAn por Crithidia luciliae fueron positivos por ELISA, sino que algunos sueros anti-DNAn negativo por Crithidia luciliae y anti-ENA positivos (anti-Sm y RNP) por Ouchterlony, presentaron reactividad contra el DNAn purificado. Solo 7 de los 18 sueros anti-ENA positivos no mostraron reactividad contra el DNAn purificado, lo que en conjunto con nuestra propia observación empleando un sistema de inhibición con estos antígenos sostiene que nuestra técnica elimina razonablemente la posibilidad de detectar sueros con

anticuerpos contra estas ribonucleoproteínas. Este hallazgo es interesante, puesto que en estudios previos se ha enfatizado que la presencia de ambos marcadores parece ser un fenómeno mutuamente excluyente, teniendo como base algunas observaciones, que analizamos a continuación.

Dentro de los (ENA), se han caracterizado más de 20 de estos antígenos por técnicas de inmunoprecipitación o inmunotransferencia, que claramente muestran estar constituidos de una porción peptídica, unida a un RNA pequeño (RNAs) pero no contienen DNA. Esto se ha puesto de manifiesto usando antígenos marcados con fósforo o aminoácidos radiomarcados que luego de ser precipitadas por un anticuerpo y transferidos usando membranas de nitrocelulosa, muestran un patrón de corrimiento característico del tipo de RNA al cual se unen.

En modelos experimentales, se ha encontrado que la producción de los anticuerpos anti-DNA es modulada por un gene mutante (lpr), mientras que la síntesis de los anticuerpos anti-Sm carece de esta influencia. Por otra parte, la producción de los anticuerpos anti-Sm es regulado por las células T y los anticuerpos anti-DNA pueden aparecer independientemente de este control (17).

Finalmente los antecedentes raciales en el humano han revelado que los Negros o Chinos producen más frecuentemente anticuerpos anti-Sm y anti-RNP simultáneamente, y que los anticuerpos anti-Sm son más comunes en poblaciones afroamericanas que en los sajones. Además el estudio en el

sistema mayor de histocompatibilidad han mostrado una asociación entre el HLA-DR2 y la presencia de anticuerpos contra DNAn, y la asociación del haplotipo B8 DR3 con los anticuerpos anti-SSB (La) y anti-SSA (Ro) (16,33,54).

Nuestra frecuencia de muestras con 2 ó más AAN, especialmente aquellos con anticuerpos anti-DNAn, y anti-ENA se ha elevado al usar el sistema de ELISA con DNA purificado, por lo que creemos que el análisis cuidadoso de estos pacientes, tomando en cuenta sus antecedentes inmunogenéticos y el posible control del sistema inmune sobre la producción de estos autoanticuerpos, podrá abrirnos este panorama de estudio.

## CONCLUSIONES

1. El estudio de los AAN mediante la técnica de ELISA nos proporcionó información sumamente útil, logrando incrementar el porcentaje de positividad de las muestras con anticuerpos anti-DNA de pacientes con LEG.

2. La purificación de DNAN y su empleo en un sistema de ELISA, nos permitió evitar la interferencia de otros autoanticuerpos.

3. El empleo de albúmina bovina metilada como interfase, fué útil para sensibilizar las placas de ELISA con DNA.

4. Al comparar la técnica de ELISA con la IFI con Crithidia luciliae, se observó que la primera es una técnica sencilla y de una alta sensibilidad.

5. El estudio de los autoanticuerpos en LEG, especialmente cuando se encuentran más de 2 especificidades inmunoquímicas, se puede realizar mediante ELISA empleando antígenos purificados.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Biología molecular de los anticuerpos. Schumacher HR. Principios de las enfermedades reumáticas. Arthritis Foundation 1:34-38, 1991

2. Sharp GC, Irvin WS, May CM, Holman HR, Mc Duffie FC, Hess EV, Schmid FR. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus, and other rheumatic diseases. N Eng J Med 295: 1149-1154, 1976

3. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield N, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 25:1271-1277, 1982

4. Lupus eritematoso generalizado. Schumacher HR. Principios de las enfermedades reumáticas. Arthritis Foundation 2:105-120, 1991

5. Kosin F, Fowler BA, Koethe SM: A comparison of the sensitivities and specificities of different substrates for the fluorescent antinuclear antibody test. Am J Clin Path 74:785, 1980

6. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA); Their immunology in medicine. Adv Immunol 33: 167-240, 1982

7. Tan EM, Kunkel HG: Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol 96:464-471, 1966

8. Isenberg DA, Shoenfeld Y, Schwartz RS. Multiple serologic reactions and their relationship to clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 27:132-138, 1984

9. Miller MH, Urowitz MB, Gladman DD, Killinger DW. Systemic lupus erythematosus in males. *Medicine* 62:327-334, 1983

10. Shoenfeld Y, Andre-Schwartz J, Stollar BD, Schwartz RS. Anti-DNA antibodies. Chap 7. En Lahita RG, Kunkel GH (Eds). *Systemic lupus erythematosus*. New York, John Wiley and Sons. pp 213-255, 1987

11. Williamson GG, Pennebaker J, and Boyle JA. Clinical characteristics of patients with rheumatic disorders who possess antibodies against ribonucleoprotein particles. *Arthritis Rheum* 26:509-515, 1983

12. Martínez-Cordero E, Burgos-Vargas R, Herrera-Esparza R, Reyes PA. Perfil de anticuerpos antinucleares en la esclerosis generalizada progresiva. Estudio multicéntrico. *Rev Invest Clin Méx* 35:273-277, 1983

13. Martínez-Cordero E: Antinuclear antibodies associated with pulmonary involvement in systemic sclerosis. *Chest* 96:960-961, 1989.

14. Pisetsky MD. Mechanisms of antinuclear antibody production in the rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin N Am* 13::569-581, 1987

15. Lightfoot RW, Hughes GRV. Significance of persisting serologic abnormalities in SLE. *Arthritis Rheum* 19: 837-843, 1976

16. Wallace DJ, Hahn BH. Dubois' lupus erythematosus. 4a ed. Lea Febiger. Chap. 19,20 pp 188-194,195-201, 1993

17. Martinez-Cordero E, Martinez-Miranda E, Negrete Garcia MC, Padilla A, Aguilar Leon DE. Anti-dsDNA and Sm autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheum* 11:341-345, 1992

18. Fisher DE, Reeves WH, Wisniewolski R, Lahita RG, Chiorazzi N. Temporal shifts from Sm to ribonucleoprotein reactivity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 28:1348-1355, 1985

19. TerBorg EJ, Horst G, Hummel E, Jaarsma D, Limburg PC, Kallenberg CGM. Sequential development of antibodies to specific Sm polypeptides in a patient with systemic lupus erythematosus: Evidence for independent regulation of anti double-stranded DNA and anti Sm antibody production. *Arthritis Rheum* 31:1563-1567, 1988

20. Kaburaki J, Stollar BD. Identification of human anti DNA, anti RNP and anti Sm and anti-SS-A serum antibodies bearing the cross reactive 16/6 idiotype. *J Immunol* 139:385-392, 1987

21. Pettersson I, Wang G, Smith EF, Wigzell H, Hedfors E, Horn J, Sharp GC: The use of immunoblotting and immunoprecipitation of (U) small nuclear ribonucleoproteins in the analysis of sera of patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. A cross-sectional, longitudinal study. *Arthritis Rheum* 29:986-996, 1986

22. Clotet B, Guardia J, Pigraw C, Lience E, Murcia C, Pujol R, Bacardi R: Incidence and clinical significance of anti-ENA antibodies in systemic lupus erythematosus. Estimation by counterimmuno-electrophoresis. *Scand J Rheum* 13:15-20, 1984

23. Beaufile M, Kouki F, Mignon F, Camus JP, Morel-Maroger L, Richet G: Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 74:201-205, 1983

24. Barada FA, Andrew BS, Davis JS, Taylor RP: Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 24:1236-1244, 1981

25. Reyes PA, Tan EM: DNA binding property of Sm nuclear antigen. *J Exp Med* 145:749-753, 1977

26. Jonsson J, Schilling W, Norberg R. On the biochemical nature of the Sm nucleoplasmic antigen. *Scand J Immunol* 13:175-187, 1981

27. Cortés JJ, Mendoza F and Reyes PA. Antibodies to ribosomal ribonucleoprotein. Prevalence in systemic rheumatic diseases and partial characterization of the antigen. *J Rheum* 14: 727-731, 1987

28. Maddison PJ, Provost TT, and Reichlin M. Serological findings in patients with "ANA-Negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981

29. Seres T, Kawai M, Zsindely A, and Szegedi. Quantitation of anti-ENA antibodies by a modified ELISA in patients with SLE and MCTD. *Scand J Rheum* 56: 75-77, 1985

30. Kawai M, Zsindely A, Seres T, Szegedi. Quantitation of antibodies to ENA with an ELISA on polystyrene plates precoated with mBSA. *Scand J Rheum* 56:72-74, 1985

31. Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett F. Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 29: 196-206, 1986

32. Takano M, Agris P, Sharp G. Purification and biochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein antigen using purified antibody from serum of a patient with mixed connective tissue disease. *Clin Invest* 65: 1449-1456, 1980

33. Arnett FC, Hamilton RG, Roebber MG, Harley JB, Reichlin M. Increased frequencies of Sm and nRNP autoantibodies in american blacks compared to whites with systemic lupus erythematosus. *J Rheum* 15: 1773-1776, 1988

34. Warlow RS, Uko G, McCluskey J, Kay PH, Christiansen FT, Dawkins RL. Extractable nuclear antigen (ENA) autoantibodies in SLE: an immunogenetic relationship with HLA, C4 and Bf alleles. Clin Exp Immunol 63: 419-427, 1986

35. Crowe W, Kushner I. An immunofluorescent method using Crithidia luciliae to detect antibodies to double-stranded DNA. Arthritis Rheum 20: 811-814. 1977

36. Holborow, EJ. Standardisation in immunofluorescence, Blackwell Scientific Pub. Oxford and Edinburgh. 1970.

37. Wysenbeeck AJ, Mandel DR, Mayes MD, Clough JD. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus of late onset. Cleve Clin J 52:119-122, 1985

38. Smeenk RT, Lucassen VAM, Swaak TJG: Is cardiolipin activity a cross reaction of anti-DNA or a separate entity. Arthritis Rheum 30:607-617, 1987

39. Aotsuka S, Okawa M, Ikebe K, Yokohari K. Measurement of anti-double-stranded DNA antibodies in major immunoglobulin classes. J Immunol Meth 28:149-162, 1979

40. Deng JS, Sontheimer RD, Lipscomb MF, Gilliam JN. The binding of antihistone antibodies to Crithidia Luciliae kinetoplasts is growth cycle-dependent. Arthritis Rheum 28:163-164, 1985

41. Kawai M, Banyai A, Zsindely A, Sonkoly I, Szegedi GY. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to native DNA in sera of patients with SLE. J Immunol Meth 48: 169-175 1982

42. Halpern R, Schiffenbauer J, Solomon G, Diamond B. Detection of masked anti-DNA antibodies in lupus sera by a monoclonal anti-idiotypic. *J Immunol* 133: 1852-1856, 1984

43. Madaio MP, Schattner A, Shattner M, Schwartz RS. Lupus serum and normal human serum contain anti-DNA antibodies with the same idiotypic marker. *J Immunol* 137: 2535-2540, 1986

44. Eisenberg RA. Association between the Ro and La antigenic determinants: immunodiffusion analysis of human spleen extract. *J Immunol* 135: 1707-1711, 1985

45. Leibfarth J, Persellin RH. Characteristics of patients with serum antibodies to extractable nuclear antigens. *Arthritis Rheum* 19: 851-880, 1976

46. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 102:117-122, 1969

47. Separation of single-stranded and double-stranded by hydroxyapatite chromatography. Sambrook. Fritsch. Maniatis (Ed). *Molecular cloning a Lab manual*. 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp- E.30-E.33, 1989

48. Rubin RL, Joslin FG, Tan EM. An improved ELISA for native DNA by elimination of interference by histone antibodies. *J Immunol Meth* 63:359-366, 1983

49. Rose. *El laboratorio en inmunología clínica*. 2a. edición. Edit. Panamericana. Buenos Aires Argentina. pp. 414-426, 1984

50. Gripenberg M, Helve T, Kurki P. Profiles of antibodies to histones, DNA and IgG in patients with systemic rheumatic diseases determined by ELISA. J Rheum 12: 934-939, 1985

51. Tan EM, Schur PH, Carr RI. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 45:1732-1740, 1966

52. Pisetski DS. Systemic Lupus Erythematosus. Med Clin N Am 70:337-353, 1986

53. Antinuclear Antibodies. Kelley WN, Harris HD, Ruddy S, Sledge CB. Textbook of Rheumatology. 2a. ed. USA. pp-690-707, 1985

54. Antinuclear Antibodies. Wallace DJ, Hahn BH. Dubois/lupus erythematosus. 4a ed. Lea Febiger. 22,24,25: pp-216-224,233-253, 1993

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Preparación de soluciones

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

$C_6H_5Na_3O_7$ ..... ....29.4 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH con ácido fósforico antes de aforar a 1 l. Conservar a 4°C

2. Solución amortiguadora de fosfatos salina (0.1M, pH7.2)

Solución A (0.2 M)

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

Solución B (0.2 M)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro .....28.4 g

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

Mezclar:

Solución A.....165 ml.

Solución B.....335 ml.

$\text{NaCl}$ .....74 g.

Agregar agua destilada y ajustar el pH con  $\text{NaOH}$  concentrada antes de aforar a 1 l. Conservar a temperatura ambiente.

3. Solución amortiguadora de fosfato salina(0.01,pH7.2)

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

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

Tomar 100 ml de la solución 3 y adicionar agua destilada, posteriormente agregar 500  $\mu\text{l}$  de Tween-20 y afora a 1 l, ajustando antes el pH a 7.2. Conservar a 4°C.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 5. Acido sulfúrico 2.5 N.

$H_2SO_4$  conc.....13.3 ml

Adicionar lentamente en agua destilada y aforar a 100

ml. Conservar a 4°C.

## 6. Solución amortiguadora de TRIS-EDTA (200 ml)

		Stok	Vol.
TRIS	10mM=0,01M	1M	2ml
EDTA	1mM=0.001M	0.5M	0.4ml

Adicionar los dos volúmenes en agua destilada y aforar a 200 ml.

## 7. Sustrato de peroxidasa con O-fenilendiamina

$C_6H_8N_2$ .....4 mg

$H_2O_2$ .....5  $\mu$ l

Amortiguador

de citratos.....10 ml

## 8. Solución amortiguadora de bicarbonatos (0.1 M, pH8.0)

$NaHCO_3$ .....8.4 g

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

## 9. Albúmina al 1% en PBS-T.

Albúmina ..... 2.5gr

Disolver en agua destilada, y aforar a 250 ml.

## 10. Soluciones para determinación de proteínas

### Solución A:

50 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en NaOH 0.1N

0.5 ml de tartrato de Na y K al 2%

0.5 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%

### Solución B:

Reactivo de Folin-Ciocalteus 1:2

Estándar de Proteínas.

Albumina Sérica

Bovina (ASB).....100  $\mu\text{g/ml}$

## Anexo 2

### Métodos y Fundamentos

#### Anticuerpos antinucleares (ANA) por inmunofluorescencia (IFI)

La técnica de IFI fue desarrollada por Coons en 1940 y definida cuantitativamente por Beutner y asociados en 1960.

Esta técnica de inmunofluorescencia combina métodos histoquímicos e inmunoquímicos para detectar complejos antígeno-anticuerpo presentes en secciones de tejidos, frotis de células, teñidos con la ayuda de fluorocromos conjugados a un anticuerpo.

La presencia de AAN en los sueros problemas fue demostrado por una fluorescencia verde-amarillenta cuando se observó bajo el microscopio de fluorescencia.

Esta técnica de inmunofluorescencia, es capaz de detectar múltiples anticuerpos, sin embargo, es necesario tener cuidado en la identificación e interpretación de los patrones.

#### Células HEp-2

Las células HEp-2, son células cultivadas humanas (carcinoma de laringe humano) y en cada pozo hay una mezcla de células en interfase en varios periodos de mitosis. Durante la mitosis, la membrana nuclear se disuelve y se ve fácilmente la ubicación de las características de los cromosomas en cada fase.

#### Anticuerpos anti-DNAN por Crithidia luciliae

Esta prueba permite identificar anticuerpos contra DNAN y DNAd empleando un hemoflagelado como sustrato. Este parásito que no es patógeno para el hombre, posee un mitocondrion que contiene una gran masa condensada de DNAN y en algunos DNA de cadena sencilla.

En comparación con otros métodos para la detección de anticuerpos DNAN, como la inmunodifusión, fijación de complemento, aglutinación pasiva, contraimmunoelectroforésis y radioinmunoensayo, el método de Crithidia luciliae tiene alta especificidad. Este método de IFI lo describe inicialmente Aarden y Col y aparece como específico para la

detección de anticuerpos DNAn, aunque son detectados anticuerpos DNAd e histonas la interpretación del tipo de fluorescencia permite su distinción.

La placa contiene Crithidia luciliae como sustrato antigénico. Cuando este sustrato es puesto en contacto con el suero diluido e incubado a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti- DNAn si están presentes, se unirán a los sitios antigénicos específicos en el cinetoplasto del hemoflagelado.

#### **Inmunodifusión (Ouchterlony)**

En la doble difusión en agar, ambos componentes (antígeno y anticuerpo) difunden simultáneamente a partir de pozos cercanos de modo que se forma un gradiente de concentraciones que al llegar al punto de equivalencia forman bandas visibles de precipitación.

Este método permite conocer diversos sistemas antígeno-anticuerpo; así como reconocer similitudes antigénicas parciales o totales. Es de gran importancia establecer para cada caso en particular las condiciones óptimas de reacción, ya que la concentración relativa de reactivos y la fuerza iónica y pH del medio afectan la aparición de bandas de precipitación.

#### **Método de Lowry**

Este método es uno de los más ampliamente utilizados para la determinación de proteínas.

Su realización se basa en la interacción inicial de la proteína con los iones de  $\text{Cu}^{++}$  en un medio alcalino. Esta reacción inicial forma un complejo inestable, y una reducción posterior de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno respectivamente.

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

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

**Soluciones:**

Solución A

Solución B

Estándar de proteínas

ASB 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

## Curva de calibración

No. de tubo	1	2	3	4	5	6	7
-------------	---	---	---	---	---	---	---

---

Condición	ml						
-----------	----	--	--	--	--	--	--

Est. proteína	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	
---------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--

Agua dest.	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0	
------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--

Sol. A (3ml)	_____						
--------------	-------	--	--	--	--	--	--

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

Sol. B (0.3ml)	_____						
----------------	-------	--	--	--	--	--	--

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

**ELISA**

Este método inmunoenzimático, está basado en el empleo de un soporte, generalmente en fase sólida a la cual se pueden acoplar antígenos o anticuerpos, optimizando esta unión con una solución de pH alcalino.

La identificación de la reacción se logrará al emplear un marcaje de antígenos o anticuerpos con enzimas. De esta forma un anticuerpo es capaz de captar un antígeno específico presente en un suero problema, que a su vez será capaz de reaccionar con un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente.

En este trabajo se utilizó una fase sólida de poliestireno a la cual se unió un DNA purificado que permitió identificar anticuerpos específicos. Esta reacción antígeno-anticuerpo fue evidenciada a través de un segundo anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa.

#### INDICES

Índice de abreviaturas

Métodos de laboratorio

ELISA      ensayo inmunoenzimático

Inmunodifusión (Ouchterlony)

Método de lowry

IFI (Inmunofluorescencia indirecta)

Reactivos

PBS      solución amortiguadora de fosfatos

HCl      ácido clorhídrico

IgG      inmunoglobulina G

BSA      albúmina sérica bovina

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>      ácido sulfúrico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>      peróxido de hidrógeno

## Términos estadísticos

DE	desviación estandar
r	coeficiente de correlación
VP	verdadero positivo
VN	verdadero negativo
FN	falso negativo
FP	falso positivo

## Unidades de Medida

M	molaridad
g	gramo
$\mu$ g	microgramo
ng	nanogramo
mg	miligramo
$\mu$ l	microlitro
ml	mililitro
l	litros
g	gramos
hr	horas
°C	grados centígrados
pH	potencial hidrógeno
TA	temperatura ambiente
D.O.	densidad óptica
nm	nanómetro