



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

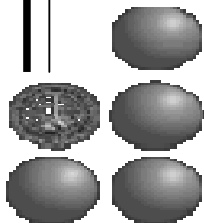
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO.
INSTITUTO DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR
ZUBIRAN

TITULO: “CARACTERIZACIÓN DE LAS BANDAS DE
PROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LOS AUTOANTICUERPOS QUE
DAN PATRONES NO DESCRITOS EN LA LITERATURA,
DETECTADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA
INDIRECTA EN CÉLULAS HEp-2”.

Tesina que para obtener el Título de Especialista en Bioquímica
Clínica, presenta:

Alumna:
Gigliola Idaly Acosta Muñoz

Asesor:
Dr. Javier Cabiedes Contreras



INCMNSZ

MEXICO, D.F. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

- Presidente:* Dr. Julio Granados Arriola (INCMN"SZ")
Vocal: Dr. José Perea Jáuregui (CARPERMOR, S.A. de C.V.)
Secretario: M. en C. Rodolfo Pastelón Palacios (FQ)
Primer suplente: Dr. Samuel Canizales Quinteros (INCMN"SZ")
Segundo suplente: QFB. Josefa Piedras Ross (INCMN"SZ")

Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en el laboratorio clínico del departamento de Inmunología y Reumatología.

Asesor del Tema:

Dr. Javier Cabiedes Contreras

Sustentante

Q.F.B. Gigliola Idaly Acosta Muñoz

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el doctor Javier Cabiedes Contreras, por su grandeza académica y humana y por la infinita paciencia y generosidad en la entrega de sus conocimientos.

A las personas que de una u otra forma contribuyeron con la realización de este estudio: Aracelly, Teresa, Carlos, Diego, Elizabeth, Edith, Irma, y Virginia

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

DEDICATORIAS

A mi esposo Juan Felipe por su amor, entrega y apoyo incondicional.

A mis padres María y José, autores de mi vida y mi esencia, mi mejor ejemplo de amor, lucha y tenacidad.

A mi tierno angelito, Daniela.

A Yolanda, Dora, Martha, Luz Dary y Jimena.

A mi gran amiga Marisol.

ABREVIATURAS

AAN: Anticuerpos antinucleares
AR: Artritis reumatoide
cbp: Cuanto baste para
DID: Inmunodifusión doble
DNA: Acido desoxirribonucleico
DNAd: Acido desoxirribonucleico de cadena doble
DNAs: Acido desoxirribonucleico de cadena sencilla
EIT: Electroinmunotransferencia
ELISA: Ensayo inmunoenzimático
EMTC: Enfermedad mixta del tejido conectivo
ESP: Esclerosis sistémica progresiva
FITC: Conjugado de isotiocianato de fluoresceína
IF: Inmunofluorescencia
IFI: Inmunofluorescencia indirecta
LEG: Lupus eritematoso generalizado
MEM: Medio mínimo esencial
PM/DM: Polimiositis- dermatomiositis
RIA: Radioinmunoensayo
RNA: Acido ribonucleico
SaFL: Síndrome antifosfolípido
SSj: Síndrome de Sjögren
TA: Temperatura ambiente

INDICE

i	Portada
ii	Asignación de jurado
iii	Agradecimientos
iv	Dedicatorias
v	Abreviaturas
vi.	Indice

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con la cromatina	6
3.1.1 Anticuerpos anti-DNAcd	6
3.1.2 Anticuerpos anti-nucleosoma	6
3.1.3 Anticuerpos anti-histonas	6
3.1.4 Anticuerpos anti-centrómero	7
3.1.5 Anticuerpos anti-Sc170	7
3.2 Anticuerpos que reconocen antígenos no relacionados con la cromatina	7
3.2.1 Anticuerpos anti-Ku	7
3.2.2 Anticuerpos anti-U1RNP	7
3.2.3 Anticuerpos anti-Sm	8
3.2.4 Anticuerpos anti-U2RNP	8
3.2.5 Anticuerpos anti-hnRNP	8
3.2.6 Anticuerpos anti-SSa (Ro)	8
3.2.7 Anticuerpos anti-SSb (La)	9
3.2.8 Anticuerpos anti-p80 coilin	9
3.3 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con los nucléolos	9
3.3.1 Anticuerpos anti-7-2RNP (anti-Th/To)	9
3.3.2 Anticuerpos anti-PM-Scl	9
3.3.3 Anticuerpos anti-U3RNP	9
3.3.4 Anticuerpos anti-RNA polimerasa I	10
3.3.5 Anticuerpos anti-NOR-90	10
3.3.6 Anticuerpos anti-RNA helicasa	10

3.4	Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con el ciclo celular	11
3.4.1	Anticuerpos anti-PCNA	11
3.4.2	Anticuerpos anti-Na	11
3.5	Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con la membrana nuclear	11
3.5.1	Anticuerpos anti-lámina nuclear o anti-lamininas	11
3.5.2	Anticuerpos anti-complejo de los poros nucleares	11
3.6	Anticuerpos que reconocen estructuras citoplasmáticas	12
3.6.1	Anticuerpos anti-mitocondrias	12
3.6.2	Anticuerpos anti-ribosomas	12
3.6.3	Anticuerpos anti-Jo-1	12
3.6.4	Anticuerpos anti-aparato de golgi	13
3.6.5	Anticuerpos anti-endosoma	13
3.7	Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con el aparato mitótico	13
3.7.1	Anticuerpos anti-huso mitótico	13
3.7.2	Anticuerpos anti-aparato nuclear-1 (NuMA-1)	13
3.7.3	Anticuerpos anti-aparato nuclear-2 (NuMA-2)	14
3.8	Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con el citoesqueleto	14
4.	Justificación	16
5.	Hipótesis	17
6.	Objetivos	18
6.1	Objetivo general	18
6.2	Objetivos específicos	18
7.	Materiales y métodos	19
7.1	Selección de muestras	19
7.2	Inmunofluorescencia indirecta	19
7.3	Cultivos celulares	20
7.4	Purificación de las fracciones nucleares y citoplasmáticas	20
7.5	Cuantificación de proteínas	21
7.6	Electroforesis de proteínas	21
7.7	Electroinmunotransferencia (EIT)	21
7.8	Cálculo de los pesos moleculares de las proteínas reconocidas por los autoanticuerpos	22
7.9	Inferencia de las proteínas reconocidas por los autoanticuerpos presentes en las muestras	22

8. Resultados	24
9. Discusión	40
10. Conclusiones	44
11. Anexos	45
12. Referencias	49

1. RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos séricos que reconocen diferentes componentes celulares. Los anticuerpos antinucleares son de gran utilidad para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes con enfermedades autoinmunes. Los autoanticuerpos pueden detectarse mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), con la que se observan patrones de fluorescencia, en su mayoría bien caracterizados, según los antígenos que reconocen.

En ocasiones se observan patrones o características, que no corresponden a las descritas previamente en la literatura. El objetivo del trabajo fue determinar si los patrones de inmunofluorescencia (IF) corresponden a autoantígenos para los cuales no se ha descrito presencia de autoanticuerpos. Para ello cultivamos células HEp-2 y separamos por lisis osmótica y sonicación las proteínas de los compartimentos nucleares y citoplasmáticos. Con los extractos y mediante electroinmunotransferencia (EIT) caracterizamos el patrón de bandas de proteínas que reconocían sueros seleccionados que presentaban patrones de IF con características no descritas previamente. Determinamos los pesos relativos de las proteínas obtenidas usando un analizador de imágenes y lo comparamos con los pesos de los antígenos reportados en la literatura. Estudiamos nueve pacientes, cuatro que presentaron tinción periférica o delineada de los nucleólos, los cuales reconocieron una banda de aproximadamente 55 kDa que podría ser un autoantígeno nuevo, o un autoantígeno con características no descritas previamente. Otros cuatro presentaron tinción de vesículas en el citoplasma, sin embargo, no identificamos ninguna proteína que pudiera estar dando dicho patrón. Observamos que de siete sueros con patrones de IF bien definidos, seis presentaron bandas que no tuvieron un autoantígeno probable descrito previamente. Aunque la presencia en los cultivos de células en división y limitaciones técnicas pudieron haber impedido la purificación de las diferentes proteínas de los lisados nucleares y citoplasmáticos, y la modificación de los epítopes pudo haber impedido la identificación de ciertos anticuerpos mediante EIT, podemos concluir que existen muchos autoantígenos para los cuales no se ha descrito presencia de autoanticuerpos por IFI. La presencia de nucleólos delineados parece ser un patrón de IF que dan autoanticuerpos no reportados. Las vesículas citoplasmáticas poseen diferentes autoantígenos para los cuales existen reportes en la literatura de diferentes autoanticuerpos. En el estudio de los autoanticuerpos antinucleares, aún queda mucho camino por recorrer.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes generalizadas y órgano específicas constituyen una serie de entidades nosológicas como lupus eritematoso generalizado (LEG), síndrome de antifosfolípido (SaFL), síndrome de Sjögren (SSj), esclerosis sistémica progresiva (ESP), polimiositis-dermatomiositis (PM/DM), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), artritis reumatoide (AR), vasculitis, etc. [1]. Se calcula que aproximadamente el 10% de la población general padece alguna enfermedad reumática [2], con grados variables de dolor, discapacidad y deformidad, afectando no sólo la calidad de vida sino también la tasa de mortalidad.

Las enfermedades autoinmunes y otras, como algunas infecciones [3] o enfermedades malignas [4] por ejemplo, se asocian con la presencia de anticuerpos antinucleares (AAN) y para algunas de ellas estos autoanticuerpos constituyen uno de los criterios diagnósticos, además de ser útiles en el pronóstico y monitoreo del tratamiento [5]. Algunos autoanticuerpos pueden incrementar sus títulos séricos años antes de que se establezca una enfermedad autoinmune [6].

La detección de los AAN en los sueros de pacientes, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), constituye una prueba tamiz [7] ampliamente usada en los laboratorios [8], la cual sugiere, según el patrón que se observe, el antígeno contra el cual están dirigidos los AAN. Diferentes tipos celulares y tejidos pueden ser usados para la detección de los AAN mediante IFI, sin embargo, dadas las características de las células HEp-2, éstas son usadas con mayor frecuencia en muchos laboratorios [9] [10]. Las células HEp-2 son una línea celular de epitelio de laringe humano, tienen núcleos grandes y material nuclear y citoplásmico abundante (vg. más de 46 cromosomas, más de dos nucleolos, muchas más mitocondrias, etc.) lo cual facilita la identificación de autoanticuerpos contra las diferentes estructuras.

Para determinar la especificidad de los autoanticuerpos, y dado que a menudo los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunes tienen más de uno, es necesario realizar inmunoensayos confirmatorios [11] [12], como inmunodifusión doble (DID), inmunoprecipitación, radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) o electroinmunotransferencia (Western blot; WB).

Los autoanticuerpos detectados en las enfermedades autoinmunes se denominan clásicamente “anticuerpos antinucleares” por que fue en este compartimiento celular donde se hicieron las primeras observaciones, sin embargo, ellos pueden estar dirigidos también contra proteínas del citoplasma o de las membranas.

Un número importante de patrones de inmunofluorescencia se encuentran bien caracterizados y se conocen las proteínas celulares contra las que están dirigidos [13], sin embargo, algunos patrones presentan características que los hacen diferentes a los descritos, lo que sugiere la presencia de patrones no descritos en la literatura.

3. ANTECEDENTES

El descubrimiento de las células LE fue muy importante en la investigación inmunológica del lupus y facilitó la identificación creciente de autoanticuerpos [14]. Se han descrito patrones de inmunofluorescencia donde los anticuerpos están dirigidos contra estructuras claramente visibles además de proteínas que se sintetizan de novo o que participan en funciones específicas en ciertas etapas del ciclo celular (Figura 1).

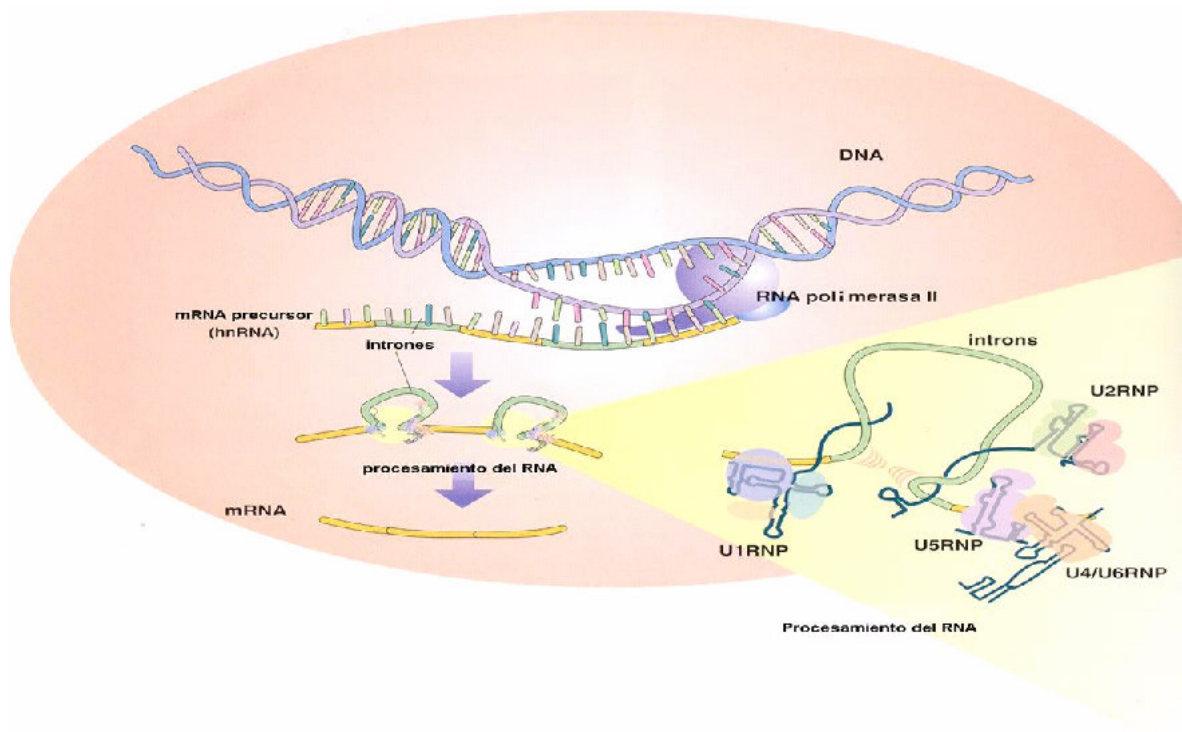


Figura 1. Proteínas asociadas a RNA (RNPs) encargadas del proceso de corte y empalme (splicing) de los transcritos de RNA que son blanco de algunos autoanticuerpos. Tomado de Atlas of Antinuclear Antibodies. MBL.

Desde su identificación, el número de autoanticuerpos detectados mediante ensayos inmunoenzimáticos ha ido en aumento, sin embargo, el de patrones de inmunofluorescencia en células HEp-2 no se ha incrementado proporcionalmente. A continuación describimos algunos de los patrones de inmunofluorescencia reportados en la literatura y los antígenos que se han relacionados con su presentación.

3.1 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con la cromatina

3.1.1 Anticuerpos anti-DNAcd:

La cromatina está compuesta por DNA de cadena doble (cd) y sus proteínas de unión (histonas y no histonas). Durante la interfase del ciclo celular, la cromatina se encuentra dispersa en el nucleoplasma y durante la mitosis la cromatina se condensa para formar los cromosomas. Los anticuerpos contra DNAcd pueden detectarse mediante inmunofluorescencia usando como sustrato células HEp-2 y los patrones que presentan dichos anticuerpos son homogéneos o periféricos. Su presencia se considera muy útil en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con LEG [15] [16].

3.1.2 Anticuerpos anti-nucleosomas:

En las diferentes fases del ciclo celular, el DNA sufre cambios estructurales importantes, uno de ellos es el enrollamiento alrededor de proteínas el cual da lugar a la formación del nucleosomas. Los nucleosomas consisten de un octámero de histonas (dos moléculas de cada subunidad H2A, H2B, H3 y H4) alrededor del cual se enrollan 200 pb de DNA, éste complejo es contra el que se dirigen algunos autoanticuerpos [17] [18]. Los epítopes que reconocen los anticuerpos anti-nucleosomas están formados por la unión del DNA y las histonas, ya que en los pacientes con LEG que tienen en circulación anticuerpos que reconocen nucleosomas pueden no reconocer sus constituyentes por separado DNAcd, DNACs o histonas [19]. La presencia de los anticuerpos anti-nucleosomas correlaciona con actividad de la enfermedad en los pacientes con LEG [20] [21].

3.1.3 Anticuerpos anti-histonas:

Los anticuerpos que reconocen histonas tienen sus epítopes en las proteínas H1, H2A, H2B, H3 y H4, o en los complejos H2A-H2B o H3-H4, así como en algunas proteínas unidoras de histonas y variantes de histonas [22]. Títulos altos de anticuerpos contra el complejo H2A-H2B se asocian a un síndrome parecido al lupus, el cual es inducido por ciertos medicamentos [23] (vg. clorpromasina).

3.1.4 Anticuerpos anti-centrómero:

Los anticuerpos que dan un patrón centromérico por inmunofluorescencia indirecta, reconocen las proteínas del centrómero: CENP-B de 80 kDa, CENP-A de 17 kDa y CENP-C de 140 kDa) entre otras [24], en los diferentes estadios del ciclo celular. En células en interfase se observan entre cuarenta y ochenta puntos finos en el núcleo y esos puntos se disponen de manera alineada en las células en división (en el ecuador de la célula en metafase).

3.1.5 Anticuerpos anti-Scl-70:

Estos anticuerpos reconocen un fragmento de 70 kDa de la DNA topoisomerasa I [25]. El patrón de inmunofluorescencia en células HEp-2 es un moteado fino y puede dar positiva la tinción de la cromatina en células en división, como patrón homogéneo. La presencia de estos anticuerpos puede teñir los nucléolos.

3.2 Anticuerpos que reconocen antígenos no relacionados con la cromatina

3.2.1 Anticuerpos anti-Ku:

El antígeno Ku es un heterodímero que se une a una proteína con actividad de kinasa, denominada DNS-PKcs, para formar la proteína kinasa DNA dependiente (DNA-PK) [26]. Los estudios mediante EIT muestran que los autoanticuerpos pueden reconocer epítopes en las dos subunidades del heterodímero, la de 80 kDa o la 70 kDa o contra el complejo.

3.2.2 Anticuerpos anti-U1RNP:

Las proteínas U1RNP-68kDa, U1RNP-A de 34 kDa y U1RNP-C de 23 kDa se unen al RNA U1. Los anticuerpos anti-U1RNP reconocen epítopes en cualquiera de los tres polipéptidos [27].

3.2.3 Anticuerpos anti-Sm:

Los anticuerpos anti-Sm reconocen proteínas unidas a los RNA nucleares, las conocidas como ribonucleoproteínas, dichas proteínas son las: U1, U2, U4/U6 y U5. Parte de las moléculas de RNP son cinco polipéptidos denominados B'/B (29 kDa/28 kDa), D (16 kDa), E (12kDa), F (11kDa) y G (10kDa). Los principales epítopes de los anticuerpos anti-Sm se localizan en las proteínas B'/B, D, E, F y G.

3.2.4 Anticuerpos Anti-U2RNP:

Los anticuerpos anti-U2RNP reconocen la estructura formada por las proteínas A' de 32 kDa y B'' de 28.5 kDa. Debido a que el polipéptido B'' de la U2RNP comparte epítopes comunes con el polipéptido A de la U1RNP, los anticuerpos dirigidos contra U2RNP reaccionan también contra la U1RNP. Estos anticuerpos son conocidos como anti-U1U2RNP.

3.2.5 Anticuerpos anti-hnRNP:

Los anticuerpos dirigidos contra las ribonucleoproteínas heterogenas nucleares (hnRNP) reconocen epítopes localizados en las proteínas A/B, A1, A2, C e I, unidas a los hnRNA. El patrón de fluorescencia usando células HEp-2 es de gránulos gruesos en el nucleoplasma. Con frecuencia estos anticuerpos coexisten con los anti-U1RNP y los anti-Sm.

3.2.6 Anticuerpos anti-SSa (Ro):

Los autoanticuerpos anti-SSa reconocen ribonucleoproteínas pequeñas ricas en uridina, conocidas como hY1, hY3, hY4 y hY5. Hay dos polipéptidos de SSa, uno de 60 kDa (que contiene un mol de proteína y un mol de hY RNA) y otro de 52 kDa [28].

3.2.7 Anticuerpos anti-SSb (La):

Estos anticuerpos que reconocen epítopes localizados en la proteína SSb, la cual es un factor de terminación de la transcripción de la RNA polimerasa III. El patrón de tinción en células HEp-2 es de gránulos densos [27]. SSb se asocia con una serie de RNAs pequeños como: 5S RNA, 7S RNA, tRNA y hYRNA [29].

3.2.8 Anticuerpos anti-p80 coilin:

Los autoanticuerpos anti-p80 coilin reconocen epítopes en la proteína de 80 kDa coilina que compone el cuerpo espiral en el nucleoplasma. El patrón de fluorescencia en células HEp-2 es nuclear granular con pocos puntos, uno a seis con un promedio de dos, los cuales se observan en las fases S y G2 del ciclo celular, no se observan puntos en las células en mitosis [27] [30].

3.3 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionadas con los nucleolos

3.3.1 Anticuerpos anti-7- 2RNP (anti-Th/To):

Estos anticuerpos reconocen epítopes localizados en las proteínas RNasaMRP (7-2RNP) y RNasaP (8-2RNP). El antígeno común a las dos proteínas es la proteína Th 40/Rpp38 [31].

3.3.2 Anticuerpos anti-PM-Scl:

Los anticuerpos que dan el patrón anti-PM-Scl mediante inmunofluorescencia en células HEp-2 reconocen un complejo proteico de más de diez proteínas del nucleolo. Por su intensidad los polipéptidos más importantes son los de 75 y 100 kDa.

3.3.3 Anticuerpos anti-U3RPN:

U3 RNA es un miembro de la familia de los RNAs pequeños nucleolares (snoRNA), a estos snoRNA se les une la fibrilarina y otras proteínas. Históricamente se ha llamado

anticuerpos anti-fibrilarina a los anticuerpos anti-U3-RNP, sin embargo, la fibrilarina no es una proteína específica de U3 snoRNP, la cual puede estar también en el complejo U8, U13 y U22. Las proteínas específicas de U3 snoRNP son la Mpp10 y la hU3-55k [32].

Los anticuerpos anti-U3RNP en células HEp-2 tiñen la región de la cromatina en las células en fase de mitosis, la mejor definición del reconocimiento de la cromatina se observa en metafase [27].

3.3.4 Anticuerpos anti-RNA polimerasa I

Los autoanticuerpos conocidos como anti-RNA polimerasa I reconocen componentes proteicos de las RNA polimerasas I, II y III. Los componentes proteicos son más de diez proteínas con un rango de peso molecular de 12.5 a 210 kDa. El patrón de fluorescencia observado en células HEp-2 es nucleolar punteado.

3.3.5 Anticuerpos anti-NOR-90:

Los anticuerpos anti-NOR-90 reconocen las proteínas de la región organizadora del nucléolo (NOR) de 90 y 92 kDa, las cuales forman parte de los complejos de transcripción de la RNA polimerasa I y del factor de unión río arriba humano (hUBF). El patrón de fluorescencia en células HEp-2 es nucleolar moteado o granular y en las células en división la metafase se tiñe intensamente en la región de la cromatina.

3.3.6 Anticuerpos anti-RNA helicasa:

Estos anticuerpos reconocen epitopes en la proteína RNA helicasa nucleolar de 100kD. En las células HEp-2 estos anticuerpos dan un patrón nucleolar moteado denso sin tinción de la cromatina en la metafase.

3.4 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con el ciclo celular

3.4.1 Anticuerpos anti-PCNA

Los anticuerpos anti-PCNA reconocen un antígeno de proliferación celular codificado por un solo gen de aproximadamente 634 bp, el antígeno tiene un peso molecular de 36 kDa [33]. En la fluorescencia usando como sustrato células HEp-2 se observa variación en la intensidad y patrón de fluorescencia en las en diferentes fases del ciclo celular.

3.4.2 Anticuerpos anti-Na:

Estos anticuerpos reconocen antígenos relacionados con miosina. Estos antígenos participan en la formación del surco de escisión en las células en división. En la inmunofluorescencia con células HEp-2 se observa un patrón moteado en el núcleo principalmente en la fase G2 del ciclo celular, y la tinción se concentra en la hebra que une ambas células cuando estas se están separando en la fase final de la mitosis,

3.5 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con la membrana nuclear

3.5.1 Anticuerpos anti-Lámina nuclear o anti-lamininas:

Estos autoanticuerpos reconocen las proteínas que forman la lamina nuclear, las cuales son: lámina A (de 74 kDa), lámina B (de 68 kDa) y lámina C (de 60 kDa), así como a las proteínas que se anclan en la lamina nuclear y a la membrana nuclear, las proteínas LAP 1 y LAP 2, y el receptor de lámina B (LBR) [34].

3.5.2 Anticuerpos anti-complejo de los poros nucleares

El principal epítipo de los anticuerpos anti-complejo de los poros nucleares se localiza en la cola citoplasmática de la proteína gp210, la cual tiene un peso molecular de 210 kDa. Se han reportado otros epítopos, como es el caso de la proteína p62, o nucleoporina 62 y Tpr [34].

3.6 Anticuerpos que reconocen estructuras citoplasmáticas

3.6.1 Anticuerpos anti-mitocondriales:

Los anticuerpos que dan el patrón de fluorescencia mitocondrial en células HEP-2 como sustrato, reconocen miembros de la familia 2-OADC (complejo 2-oxo-ácido deshidrogenasa), incluyendo la subunidad E2, estos antígenos son PDC-E2, OGDC-E2, BCOADC-E2, E3BP y PDC11 α [35], los cuales se localizan en la cara interna de la membrana de las mitocondrias. Los anticuerpos AMA-2 son los más conocidos, sin embargo, se han reportado otros patrones denominados AMA-1 hasta AMA-9.

3.6.2 Anticuerpos anti-ribosomales:

Los anticuerpos anti-ribosomales reconocen principalmente las tres proteínas que contienen serinas fosforiladas localizadas en la subunidad grande del ribosoma (60S), P0 de 38 kDa, P1 de 19 kDa y P2 de 17 kDa. Estas 3 fosfoproteínas suelen asociarse en pentámeros, y parece ser que los autoanticuerpos pueden unirse a una sola proteína, a dos o a las tres [36]. El patrón de fluorescencia que dan anticuerpos en células HEP-2 es citoplasmático homogéneo con mayor intensidad perinuclear.

3.6.3 Anticuerpos anti-Jo 1

Los anticuerpos anti-Jo-1 reconocen la histidil tRNA sintetasa, la cual cataliza la unión de la histidina al 3'OH de la tRNA His. Mediante inmunofluorescencia indirecta en células HEP-2, estos anticuerpos dan un patrón punteado en el núcleo o en el citoplasma, los cuales se observan con mayor frecuencia en el citoplasma, rodeando al núcleo y disminuye su concentración hacia la membrana de citoplásmica. Anticuerpos contra otras aminoacil-tRNA sintetatas también han sido descritos, y se les conoce como: anticuerpos anti-RSs. Ejemplos de éstos son: Pl-7 (treonil tRNA sintetasa), PL 12 (alanil tRNA sintetasa), OJ (isoleucil tRNA sintetasa), EJ (glicil tRNA sintetasa) y KS (asparaginil tRNA sintetasa) [37]. El patrón de tinción que dan éstos autoanticuerpos en

células HEP-2 detectados por IFI es igual al de los anticuerpos anti-Jo1.

3.6.4 Anticuerpos anti-aparato de Golgi:

El complejo de golgi se encarga del procesamiento, transporte, glicosilación y almacenamiento de proteínas nuevas sintetizadas en el retículo endoplásmico. Los anticuerpos que dan el patrón Golgi reconocen a la proteína de 230 kD, la proteína de 97 kDa (golgi-97) y a la proteína golgi-67 de 67kDa, entre otras.

3.6.5 Anticuerpos anti-endosoma:

Estos autoanticuerpos reconocen antígenos localizados en los endosomas como: EEA1 de 162 kDa, CLIP170 de 170 kDa, GRASP-1 de 110 kDa, y LBPA. Mediante inmunofluorescencia indirecta estos anticuerpos se observan como pequeños puntos en el citoplasma, los cuales varían en número según el antígeno hacia el cual están dirigidos [38].

3.7 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con el aparato mitótico

3.7.1 Anticuerpos anti-huso mitótico:

Estos anticuerpos reconocen a la tubulina, el principal componente de los microtúbulos del huso mitótico.

3.7.2 Anticuerpos anti-aparato mitótico nuclear-1 (NuMA-1):

Los anticuerpos que dan el patrón NuMA-1 reconocen una proteína de 210 kDa. Mediante IFI en células HEP-2 las células en interfase muestran un patrón moteado en el núcleo sin tinción en los nucleolos ni del citoplasma.

3.7.3 Anticuerpos anti-aparato mitótico nuclear-2 (NuMA-2):

Estos anticuerpos reconocen a la cinesina HsEg5 de 130 kDa. Esta es una proteína motora de unión a los microtúbulos del huso mitótico. En el ensayo de IFI usando como sustrato células HEp-2 las células que se tiñen, son aquellas en interfase. No se observa tinción en el núcleo ni en el citoplasma.

3.7.4 Anticuerpos anti-centríolo:

Los anticuerpos que dan el patrón centriolar en células HEp-2 mediante IFI reconocen la enolasa, una proteína de choque térmico de 48 kDa.

3.8 Anticuerpos que reconocen antígenos relacionados con el citoesqueleto

En general estos anticuerpos reconocen componentes del citoesqueleto. El citoesqueleto está compuesto por tres filamentos básicos: microfilamentos (actina, miosina, tropomiosina, alfa actina), microtúbulos (tubulina) y filamentos intermedios (vimentina, desmina, GFAP, periferina, neurofilamentos, alfa intrenesina y lámina nuclear) [39]. Mediante IFI usando como sustrato células HEp-2 el patrón que se observa es como de hilos o cabellos en el citoplasma. No es posible diferenciar cual es el antígeno que reconocen los autoanticuerpos presentes en el suero de un paciente en particular. Lo que puede confirmar el antígeno específico es el uso de pruebas más sensibles y específicas como los ensayos inmoenzimáticos (ELISA, EIT).

Las figuras 2, 3, 4 y 5 dan ejemplo de algunos patrones mencionados: homogéneo, moteado fino, mitocondrial y NuMA-1.

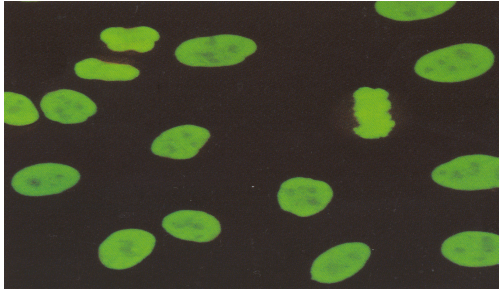


Figura 2: Patrón homogéneo

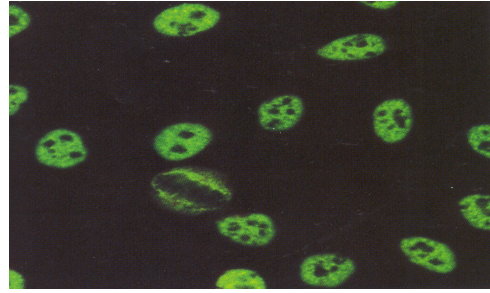


Figura 3: Patrón moteado

fino

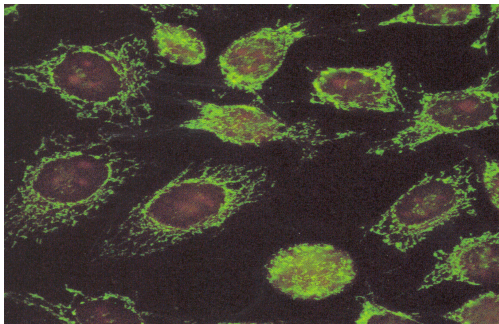


Figura 4: Patrón mitocondrial

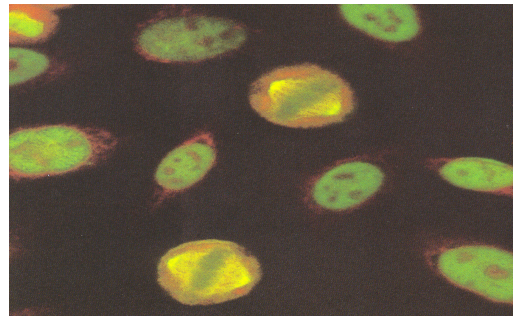


Figura 5: Patrón NuMA-

1

.Patrones de inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato células HEP-2.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de la inmunofluorescencia para la detección de los anticuerpos antinucleares, los cuales ayudan al diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes con enfermedades autoinmunes y al creciente interés mundial por esta prueba, se hace necesario caracterizar aquellos patrones, que aunque suelen ser poco frecuentes, presentan características que los hace diferentes a los patrones definidos en la literatura. El estudio de los patrones atípicos ayudará a identificar nuevos autoanticuerpos relacionados con las enfermedades autoinmunes y su asociación con manifestaciones clínicas.

5. HIPOTESIS

Los patrones de IFI que muestran características que no corresponden a ningún patrón reportado, son anticuerpos que reaccionan contra proteínas celulares para las que aún no se ha descrito en la literatura, presencia de autoanticuerpos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Caracterizar las bandas de proteínas que reconocen los autoanticuerpos que dan patrones aún no descritos en la literatura, detectados mediante inmunofluorescencia indirecta.

6.2 Objetivos específicos:

Identificar patrones de tinción no descritos en la literatura, detectados mediante inmunofluorescencia, usando como sustrato células HEp 2.

Caracterizar las bandas de proteínas que reconocen los autoanticuerpos que dan patrones no descritos, detectados mediante IFI.

Caracterizar las bandas de proteínas que reconocen los autoanticuerpos que dan patrones definidos, detectados mediante IFI.

7. MATERIALES Y METODOS

El estudio consistió en dos procesos independientes: 1) la selección de los sueros de interés; 2) procesamiento del material proteico que se usó como antígeno para la detección de los autoanticuerpos presentes en los sueros.

7.1 Selección de muestras

El estudio comprendió la revisión de los sueros que llegaron al laboratorio de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ, para la detección de autoanticuerpos mediante IFI, durante el periodo constituido entre junio y noviembre de 2006. El título de la fluorescencia, para ser incluido en el estudio debía ser $\geq 1:1280$. El diagnóstico de los pacientes no se tomó en cuenta para la selección de los sueros.

7.2 Inmunofluorescencia Indirecta

Se diluyeron los sueros de los pacientes 1:40 en PBS y se aplicaron 22 μ l de la dilución en pozos de láminas que tienen células HEp-2 de la marca **The Binding Site**. Se incubaron las laminillas con las muestras en cámara húmeda durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno, con PBS 1X. Posteriormente se adicionaron 22 μ L de conjugado anti-IgG humana marcado con FITC y se incubaron las laminillas en cámara húmeda durante 20 minutos a TA. Se hicieron nuevamente dos lavados como se mencionó anteriormente y se secaron las laminillas golpeándolas contra una superficie absorbente sin tocar la superficie que contiene las células. Se agregó una gota de amortiguador de montaje, se colocó el portaobjetos y se leyó en un microscopio Zeiss Axioscop II. El título de los anticuerpos se determinó mediante un Titulador Virtual Autocyte, Image titer 3. En cada ensayo se incluyó una curva de calibración con un suero control de patrón homogéneo a las siguientes diluciones: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560 y 1:5120. Además de un control positivo y uno negativo.

7.3 Cultivos celulares

Las células HEP-2 se cultivaron en cajas de 75 ml (CORNING ®) con 28 ml de medio mínimo esencial (MEM) marca GIBCOBRL suplementado con L-glutamina, suero bovino fetal (SBF) de complementado al 15 %, 0.1% de penicilina 5000 UI/ml, estreptomycin 5000 µg/ml y 1.5 g de bicarbonato de sodio. El medio se esterilizó por filtración (0.22 µm). Las botellas de cultivo se mantuvieron con las siguientes condiciones: 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 3 a 5 días hasta obtener una confluencia del 70 al 90 %.

7.4 Purificación de las fracciones nucleares y citoplásmicas de las células HEP-2

Se desprendió la monocapa de células HEP-2 de las botellas de cultivo con un raspador de plástico (CORNING ®). Se lavaron cuatro veces las células HEP-2 con 7ml de PBS frío, y se resuspendieron en 1000 µl. Las células re-suspendidas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 µL y se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se colocó el tubo con el paquete celular en baño de hielo en etanol durante 10 minutos. Se resuspendieron las células suavemente en 150 µl de amortiguador de lisis A, más 5 µL de Triton X-100 al 1.0 % por mL de amortiguador (Anexo 1) y se centrifugaron a 3500 rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se congeló como material citoplasmático. El botón (material nuclear) se lavó con 150 µl de amortiguador de lisis C más 5 µL de Triton X-100 al 1.0 % por mL de amortiguador (Anexo 2), se resuspendió y se centrifugó a 3500 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado para eliminar el material citoplasmático. Se resuspendió el botón nuclear con 100 µl de amortiguador de lisis C y se sometió a sonicación con los siguientes parámetros: 1.8-2.0 kHz por 3 ciclos de 10 segundos con intervalos de 10 segundos entre uno y otro y se centrifugó a 14000 rpm, 4°C por 20 minutos, el sobrenadante obtenido se congeló como material nuclear. En cada paso de lisis se verificó el porcentaje de células lisadas mediante coloración vital con azul tripano en proporción 1:1. Ambos materiales fueron congelados a -70 °C hasta su uso.

7.5 Cuantificación de proteínas

Tres μl del material nuclear o citoplásmico se diluyeron en 200 μl de solución de ácido bicinconínico y sulfato de cobre II, en pozos de microplacas de ELISA (Nunc), y se incubaron a 37°C durante media hora. Se hizo la lectura de la reacción de color en un lector de microELISA SUNRISE a una longitud de onda de 562 nm. En cada determinación se incluyó una curva de calibración con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 μg de albúmina bovina sérica. Las muestras se procesaron por duplicado. La concentración final se expresó en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

7.6 Electroforesis de proteínas

Se corrieron en cada carril de minigeles de poliacrilamida-SDS 10% de 1.5 mm de grosor, 20 μg de proteína de material nuclear y citoplásmico disuelto en amortiguador de carga (proporción 1:1). Los geles se corrieron a 100 voltios hasta que el frente de colorante llegó al borde inferior del gel (1:45 hr aproximadamente). En cada corrimiento se incluyó un carril que contenía 2 μl de estándar de peso molecular de amplio rango preteñido SDS-PAGE (BIO-RAD). Se procesaron simultáneamente dos geles, uno para electroinmunotransferencia y otro para tinción con azul de Coomasie.

La tinción con azul de Coomasie se hizo a una concentración de 0.25 % (p/v) en metanol, agua y ácido acético glacial (proporción 5:5:1). Los geles se tiñeron durante 40 minutos en agitación y se decoloraron con solución ácido acético glacial, agua y metanol (proporción 1:5:5) hasta obtener un buen contraste de las bandas de proteínas (aproximadamente 12 horas).

7.7 Electroinmunotransferencia (EIT)

Las proteínas separadas mediante PAGE-SDS 10% fueron transferidas (en Mini PROTEAN® 3 cell, BIO-RAD) a membranas de nitrocelulosa GIBCOBRL durante 1 hora a 100 voltios. Posteriormente se bloquearon las membranas con una solución de leche descremada (Svelty) al 3% (p/v) en PBS toda la noche a TA en agitación. Las membranas bloqueadas se hicieron reaccionar con las diluciones de los sueros 1:10,

1:20 ó 1:30 (según cantidad disponible del suero) en contenedores de plástico desechables de 6 x 9.5 cm durante 1 hora a TA en agitación. Transcurrida la incubación, se lavaron las membranas 3 veces con 4 ml PBS-Tween 20 al 0.05% (v/v). Posteriormente se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos anti-IgG, IgM e IgA humanas conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma, Immuno Chemicals) a una dilución de 1:5000 en leche descremada (Svelty) al 3%. Se hicieron 3 lavados con 4 ml de PBS-tween 20 y un lavado con 4 ml de Tris-base 0.05 M pH 8.8. Finalmente se agregó a las membranas el sustrato de la enzima (0.1 g de Fast red: sal 4-cloro-2metilbencildiazonio y 0.05 g de α naftol: sal fosfato disodio marca SIGMA, en 50 ml de tris-base 0.05M pH 8.8). Se incubaron con agitación a TA hasta obtener las bandas de color visibles (aproximadamente 30 minutos). Se lavaron las membranas con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre una superficie absorbente.

7.8 Cálculo de los pesos moleculares de las proteínas reconocidas por los autoanticuerpos

Los patrones de bandas de las muestras fueron registrados en un analizador de imágenes (marca UVP WHITE/UV Transiluminator) y el peso molecular relativo de las proteínas fue determinado comparándolo con la migración de las proteínas del estándar de peso molecular, mediante el programa LabWorks, Image Acquisition and Análisis Software, versión 4.6 (UVP. Inc. Upland, CA, UK) para proteínas. La validación de la determinación se hizo con albúmina sérica bovina.

7.9 Inferencia de las proteínas reconocidas por los autoanticuerpos presentes en las muestras

Los pesos moleculares relativos obtenidos mediante el análisis de las bandas se compararon con los pesos moleculares de las proteínas contra las que hay autoanticuerpos reportados (Anexo 3). Consideramos el 10% de variación en los pesos de las proteínas debido a que obtuvimos los pesos moleculares relativos en función de los marcadores de peso molecular de cada corrida, en este sentido, incluimos las proteínas con un 10% de variación hacia pesos más altos y más bajos de los observados. Para asociar las bandas de proteínas reconocidas por autoanticuerpos a un antígeno determinado, analizamos las posibles proteínas teniendo en cuenta: 1) peso molecular;

2) localización en el núcleo o en el citoplasma; 3) estructura o compartimiento de la que forman parte (nucleolos, nucleoplasma, cromatina, mitocondrias, citoesqueleto, etc). En el análisis se consideró el patrón de inmunofluorescencia observado y las características del mismo.

8. RESULTADOS

Analizamos 9 muestras cuyos patrones presentaban características diferentes a los reportados en la literatura, 4 de ellos con vesículas en el citoplasma, otros 4 con nucléolos delineados, y uno con gránulos en el patrón homogéneo. Estudiamos también 7 muestras con patrones que no presentaban ninguna característica diferente a las descritas, es decir muestras con patrones definidos.

Las figuras 6 y 7 corresponden a los patrones con vesículas citoplásmicas y nucléolos delineados.

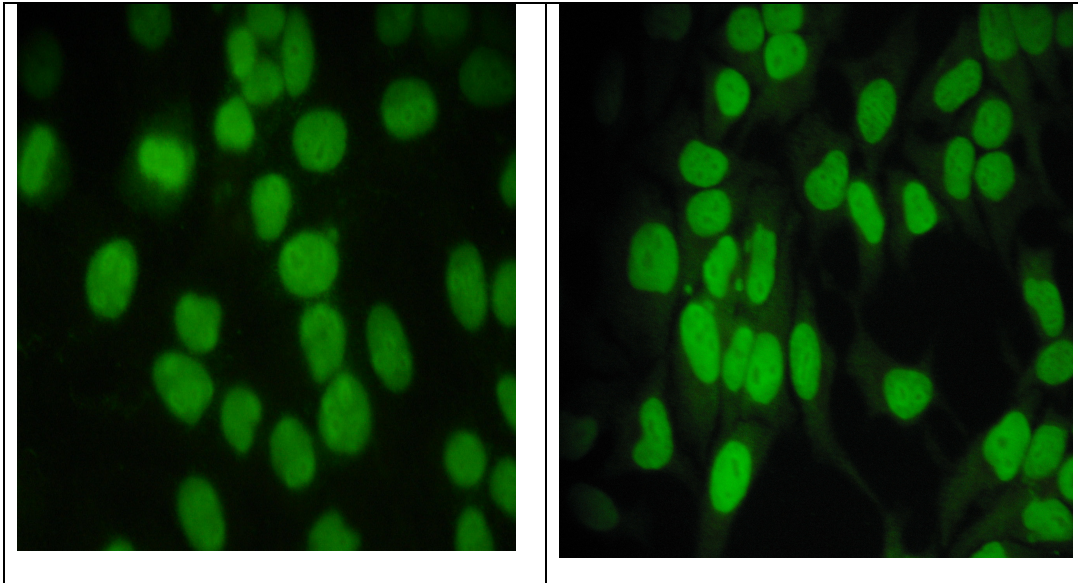


Figura 6: Nucléolos delineados

Figura 7: vesículas citoplasmáticas

Muestra problema #1:

El patrón observado por inmunofluorescencia indirecta fue: moteado fino con título 1:2560.

Descripción: Presencia de vesículas pequeñas citoplasmáticas, algunas ubicadas cerca del núcleo, las cuales fluorescen con la misma intensidad que el patrón moteado fino.

La tabla 1 muestra las características de las bandas obtenidas mediante EIT.

Tabla 1. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 1

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígenos probables
Nuclear				
1	59.2	53.3	65.1	Ro60
2	53.1	47.8	58.4	Ro52
3	31.5	28.4	34.7	U1RNPA, SmBB', U2RNPA', hnRNPA2, U2RNPB''.
Citoplasmática				
4	59.2	53.3	65.1	Ro60
5	53.8	48.4	59.2	Ro52
6	43.4	39.1	47.7	La
7	30.3	27.3	33.3	SmBB', U2RNPA', hnRNPA2, U2RNPB''

Las bandas obtenidas pueden ser explicadas por antígenos ya descritos para patrones moteados, sin embargo, dichos antígenos son predominantemente nucleares, lo cual permite explicar sólo parcialmente la presencia de ellos en citoplasma, bien sea por contaminación con material nuclear (problema de la técnica de purificación) o por que las proteínas pueden estar presentes tanto en núcleo, en membrana nuclear o en citoplasma o bien por desaparición de la membrana nuclear durante la mitosis. Aún considerando la justificación anterior, se puede observar en el citoplasma la presencia de una banda de 43.4 kDa que no se observó en el núcleo (banda citoplasmática 6) que a excepción del antígeno La, el cual se ha visto en citoplasma no puede ser explicada por un antígeno de ubicación exclusivamente citoplasmática, lo cual podría indicar la presencia de una proteína, blanco de autoanticuerpos, no descrita previamente en la literatura.

Muestra problema # 2:

Los patrones que observamos por inmunofluorescencia indirecta fueron: 1) nuclear: moteado fino 1:1280; citoplásmico: citoplasmático 1:320.

Descripción: Presencia de vesículas pequeñas citoplasmáticas (mas grandes que la que dan los peroxisomas), algunas ubicadas cerca al núcleo, las cuales fluorescen con la misma intensidad que el patrón moteado fino.

La tabla 2 muestra las características de las bandas obtenidas mediante EIT.

Tabla 2. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 2.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígenos probables
Nuclear				
1	82.7	74.4	91.0	Ku
2	61.3	55.2	67.4	Ro60
3	57.4	51.7	63.1	Ro60, Ro52
4	52.4	47.2	57.6	Ro52
5	49.5	44.6	54.5	Ro52
6	43.7	39.3	48.1	La
7	40.7	36.6	44.8	Ninguno reportado.
8	29.7	26.7	32.7	SmBB', U2RNPA', U2RNPB''
9	11.4	10.3	12.5	SmE, SmF
Citoplasmática				
12	53.1	47.8	58.4	Ro52
13	49.1	44.2	54.0	Ro52
14	43.0	38.7	47.3	La
15	37.7	33.9	41.5	P0
16	22.2	20.0	24.4	Ninguno reportado

El suero del caso 2 muestra el reconocimiento de una banda nuclear de 40.7 kDa. La revisión de la literatura mostró que no existe un antígeno similar descrito. Lo anterior sugiere que la muestra estudiada podría estar reconociendo un autoantígeno nuevo. En las bandas citoplasmáticas observamos el reconocimiento de bandas del mismo peso molecular que las observadas en los purificados nucleares. Sin embargo, en citoplasma si existe un autoantígeno con el peso observado, el antígeno P0 ribosomal (banda citoplasmática 15). La banda citoplasmática 16 de peso molecular 22.2 kDa no tiene un antígeno descrito, probable, lo que podría indicar el reconocimiento de un autoantígeno no descrito previamente. Sin embargo, y dado que antígenos del mismo peso molecular que no explican el patrón fueron también sometidos a análisis, sería posible ubicar en esta banda, al antígeno h1t, que es una variante de histonas y cuya ubicación es tanto en el núcleo como en el citoplasma [40], esto sin embargo, implica que dicho antígeno puede dar una presentación vesicular en inmunofluorescencia, cuando típicamente se reporta sólo para patrones homogéneos [22]. Es posible, en este caso y en el anterior,

observar la presencia de la banda de 43 kDa (peso molecular del antígeno La) en el citoplasma, posiblemente por contaminación o por aporte del antígeno en el citoplasma de células que se encuentran en mitosis. Con los datos obtenidos no podemos descartar ni asegurar que se trata de un autoantígeno no descrito.

Muestra problema #3:

Los patrones que observamos fueron: en el núcleo: moteado fino 1:1280 y centromérico 1:640; y en el citoplasma: citoplasmático 1:40 y anti-peroxisoma 1:320.

Descripción: Los nucléolos presentan fluorescencia en la periferia.

La tabla 3 muestra el patrón de bandeado del suero 3.

Tabla 3. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 3.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígenos probables
Nuclear				
1	51.8	46.6	57.0	La
2	43.7	39.3	48.1	macroH2A1, La
3	40.1	36.1	44.1	macroH2A1
Citoplasmática				
6	43.0	38.7	47.3	La
7	39.4	35.5	43.3	macroH2A1
8	29.7	26.7	32.7	Ninguno reportado
9	25.1	22.6	27.6	Ninguno reportado

Las bandas nucleares 2 y 3 podrían estar asociadas con el antígeno macroH2A1 dado que éste, a pesar de ser una variante de histonas, el cual se asocia a patrones homogéneos, se encuentra ubicado en el centrómero [40]; es importante mencionar que en este caso además de la presencia del patrón moteado, detectamos también un patrón centromérico con título bajo, de hecho en la EIT pudo apreciarse la diferencia en la intensidad de las bandas nuclear 1 con respecto a las nucleares 2 y 3. En nuestro análisis consideramos todas las proteínas que tuvieran los pesos moleculares que inferimos a partir de la EIT, aun cuando éstas no tuvieran relación con los patrones observados mediante IFI. Así, la banda identificada como nuclear 1 (tabla 3) podría ser la proteína hU3-55, la cual podría explicar la tinción de los nucleolos, sin embargo, no es la tinción periférica de los nucléolos la que caracteriza a la presencia de los

anticuerpos séricos contra la hU3-55 [27] [32].

En el caso de la banda citoplasmática 7 cuya proteína tiene un peso molecular aparente de 39.4 kDa, además del antígeno macroH2A1, el antígeno To, que da un patrón nucleolar punteado en células HEp-2 mediante IFI es un posible candidato, sin embargo, el patrón observado por nosotros fue un nucleolar delineado, el cual no es la presentación típica de los anticuerpos anti-To [27] [31].

Las bandas citoplásmicas 8 y 9 de pesos moleculares 29.7 y 25.1 kDa no tienen antígenos descritos, lo cual sugiere que pueden ser autoanticuerpos no descritos previamente, sin embargo, no justifican la presencia de nucléolos delineados observados en la IFI.

Muestra problema # 4:

Los patrones que observamos por IFI fueron: en el núcleo periférico 1:2560 y en el citoplasma mitocondrial 1:640. Observamos además, vesículas pequeñas citoplasmáticas, algunas ubicadas cerca al núcleo. La tabla 4 muestra el patrón de bandas que observamos mediante EIT.

Tabla 4. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 4.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígenos probables
Nuclear				
1	36.9	33.2	40.6	macroH2A1, macroH2A2
2	30.5	27.5	33.6	Ninguno reportado
3	19.2	17.3	21.1	TH2B, H2BFWT
4	12.6	11.3	13.9	H1°, H1b
Citoplasmática				
5	91.5	82.4	100.7	hAgo2
6	55.2	49.7	60.7	E3BP
7	36.9	33.2	40.6	macroH2A1, macroH2A2
8	10.6	9.5	11.7	H1°, H1b

Como se puede ver la banda nuclear 2 de 30.5 kDa no tiene un autoanticuerpo

reportado, pero su ubicación nuclear no explica la reactividad contra las vesículas que se observaron mediante IFI. El peso molecular de la banda citoplasmática 5, puede ser el antígeno hAgo2 el cual reportan como puntos citoplasmáticos, algunos de ellos alrededor del núcleo [41] los cuales pudieron quedar ocultos por los anticuerpos anti-mitocondriales que también estuvieron presentes en el suero de éste paciente (banda citoplasmática 6, proteína E3BP del patrón AMA-2). Excluyendo al antígeno hAgo2 no existe otra proteína reportada con del mismo peso molecular reconocida por autoanticuerpos. El presente podría ser un nuevo autoantígeno, sin embargo, como en los casos anteriores con los datos abstenidos no podemos descartar ni asegurar esto.

Muestra problema # 5:

El patrón dominante en el suero que a continuación describimos es un homogéneo con título de 1:5120. La característica atípica observada fue un nucleolar con fluorescencia en la periferia de ésta estructura, es decir, con nucléolos delineados. La tabla 5 muestra el patrón de bandas obtenido mediante EIT.

Tabla 5. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 5.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear 1	52.3	47.1	57.5	Ninguno reportado

La única banda observada mediante EIT no tiene ningún autoantígeno reportado. Lo que sugiere que podría ser un autoanticuerpo no descrito. Teniendo en cuenta que antígenos del mismo peso molecular que no explican el patrón fueron incluidos en nuestro análisis, la proteína nucleolar hU3-55 podría ser un candidato.

Muestra problema # 6:

Los patrones presentes en el suero 6 fueron: homogéneo 1:2560 y mitocondrial 1:160. En células en interfase observamos puntos grandes en el núcleo, lo cual es atípico para los homogéneos. En la tabla 6 se muestra el patrón de bandas detectado mediante EIT.

Tabla 6. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 6.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígenos probables
Nuclear				
1	53.4	48.1	58.7	Ninguno reportado
2	47.9	43.1	52.7	Ninguno reportado
3	40.0	36.0	44.0	Ninguno reportado
4	36.6	32.9	40.3	Ninguno reportado
5	33.7	30.3	37.1	Ninguno reportado
6	32.3	29.1	35.5	Ninguno reportado
7	16.0	14.4	17.6	H3, H3.1, H2A.X
Citoplasmática				
8	89.7	80.7	98.7	Ninguno reportado
9	71.8	64.6	79.0	Ninguno reportado
10	40.2	36.2	44.2	PDCE1 α
11	33.5	30.2	36.9	Ninguno reportado

De las bandas nucleares sólo la banda 7 tiene un antígeno reconocido por autoanticuerpos reportados. Intentando explicar la característica atípica, el análisis de los pesos moleculares de antígenos que no corresponden al patrón homogéneo muestra, que las bandas 1 y 2 podrían ser el resultado del reconocimiento de las proteínas Ro52 o La, las bandas 4 y 5 de peso molecular 36.6 y 33.7 kDa respectivamente, podrían corresponder a las proteínas U1RNPA, U2RNPA' o hnRNPA2, las cuales mediante IFI dan patrones moteados, en el caso del reconocimiento del antígeno La, el patrón es moteado grueso en el núcleo. La banda 3, de \approx 40.0 kDa podría corresponder al reconocimiento de Th y B23, cuyos autoanticuerpos dan un patrón de IFI en células HEp-2 nucleolar moteado [27].

Las bandas 8, 9 y 11 de los extractos citoplásmico no tienen antígeno descrito reportado, pero el antígeno hAgo2 es una posibilidad para la banda 8, en la que el patrón mitocondrial podría estar enmascarándolo. Sin embargo, ni ésta banda y ni la 9, de 71.7 kDa podrían explicar el patrón de puntos grandes en el núcleo, ya que fueron detectadas en la fracción citoplásmica. Las bandas 5 nuclear y citoplasmática 11 (33.7 y 33.5 kDa respectivamente) pueden ser el resultado del reconocimiento de los antígenos U1RNPA, U2RNPA' y hnRNPA2, presentes en ambas fracciones. Es importante mencionar que en ésta muestra cuantificamos anticuerpos anti-SSa (Ro) y anti-SSb (La) por ELISA y

fueron positivos los anticuerpos anti-SSa (14.2 U/ml; VN = < 10 U/mL). Lo anterior apoya el hecho de que las bandas nucleares sin antígeno probable y la banda citoplasmática 11, corresponden a antígenos propios de patrones moteados.

Muestra problema # 7

El patrón que observamos por inmunofluorescencia indirecta fue: homogéneo con títulos 1:1280. Los nucléolos presentan fluorescencia en la periferia (núcleolos delineados). La tabla 7 muestra el patrón de bandas detectado por EIT.

Tabla 7. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 7.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	53.0	47.7	58.3	Ninguno reportado
2	40.8	36.7	44.9	H5, macroH2A1, macroH2A2
Citoplasmática				
3	74.8	67.3	82.3	Ninguno reportado
4	56.9	51.2	62.6	Ninguno reportado
5	53.6	48.2	59.0	Ninguno reportado
6	24.6	22.1	27.1	Ninguno reportado

Como se puede ver la banda nuclear 1 no tiene antígeno probable que explique el patrón nucleolar periférico, sin embargo, el análisis de otros antígenos del mismo peso molecular sugiere que el antígeno hU3-55, propio de patrones nucleolares, es un candidato para la tinción periférica de los nucleolos.

En la fracción citoplásmica observamos una banda de 74.8 kDa (3) y una de 24.6 kDa (6) que tampoco han sido reportadas como autoantígenos, pero que no explican la tinción de los nucleolos, en tanto que las bandas 4 de 56.9 kDa y 5 de 25.1 kDa podrían ser el resultado del reconocimiento del antígeno hU3-55.

Muestra problema #8:

Los patrones que observamos por inmunofluorescencia indirecta fueron: 1) nuclear: homogéneo con título de 1:5120; 2) citoplásmico: citoplásmico 1.80. Observamos

además pequeñas vesículas citoplasmáticas, algunas de éstas ubicadas cerca al núcleo. La tabla 8 muestra el patrón de bandeo para este suero.

Tabla 8. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 8.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	79.1	71.2	87.0	Ninguno reportado
2	57.4	51.7	63.1	Ninguno reportado
3	56.0	50.4	61.6	Ninguno reportado
4	54.2	48.8	59.6	Ninguno reportado
5	52.7	47.4	58.0	Ninguno reportado
6	44.8	40.3	49.3	H5
7	43.0	38.7	47.3	H5, macroH2A1, macroH2A2
8	40.4	36.4	44.44	H5, macroH2A1, macroH2A2
9	39.1	35.2	43.0	H5, macroH2A1, macroH2A2
Citoplasmática				
10	74.2	66.8	81.6	Ninguno reportado
11	56.7	51.0	62.4	Ninguno reportado
12	54.9	49.4	60.4	Ninguno reportado
13	52.4	47.2	57.6	Ninguno reportado
14	43.7	39.3	48.1	H5, macroH2A1, macroH2A2
15	38.9	35.1	42.8	macroH2A1, macroH2A2

Las bandas nucleares 1 a la 5 no tienen antígeno probable reportado, pero por su ubicación no explican las vesículas citoplásmicas. En cuanto a las bandas citoplasmáticas 10 a la 13 tampoco tienen antígeno probable, su ubicación las hace buenos candidatos para explicar el reconocimiento de las vesículas; dado que estas bandas parecen corresponder a las mismas proteínas de las bandas nucleares 1 a la 5 y que consideramos la posibilidad de contaminación de material nuclear y citoplasmático.

Otra posibilidad es que las vesículas citoplasmáticas correspondan a material nuclear del patrón en estudio y no a un antígeno diferente.

Muestra problema # 9:

El patrón observado en células HEP-2 fue: nuclear homogéneo con un título 1:5120. Observamos además los nucléolos teñidos en la periferia en algunos campos observamos los nucleolos con tinción homogénea. La tabla 9 muestra el patrón de bandas obtenido mediante EIT.

Tabla 9. Electroinmunotransferencia de la muestra problema 9.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	232.4	209.2	255.6	Ninguno reportado
2	56.3	50.7	61.9	Ninguno reportado
3	52.4	47.2	57.6	Ninguno reportado
4	39.5	35.6	43.5	H5, macroH2A2
Citoplasmática				
5	70.4	63.4	77.4	Ninguno reportado
6	57.8	52.0	63.6	Ninguno reportado
7	54.2	48.8	59.6	Ninguno reportado
8	52.7	47.4	58.0	Ninguno reportado
9	50.9	45.8	56.0	Ninguno reportado
10	42.3	38.1	46.5	H5, macroH2A2
11	31.1	28.0	34.2	Ninguno reportado
12	27.7	24.9	30.5	Ninguno reportado
13	26.7	24.0	29.4	Ninguno reportado

Nuestro análisis mostró que sólo una banda del compartimiento nuclear y una del citoplásmico tienen antígeno reportado. La banda nuclear 4 y citoplásmica 10 podrían ser el producto del reconocimiento de H5 y macroH2A2. Las bandas nucleares 2 y 3, citoplásmicas 6, 7 y 8 podrían ser el producto del reconocimiento del antígeno hU3-55.

Patrón definido # 1:

El estudio de reactividad mediante IFI en células HEp-2 mostró los siguientes patrones:

1) nuclear: periférico 1:5120; 2) citoplásmico: mitocondrial 1:640.

Tabla 10. Electroinmunotransferencia del patrón definido 1.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	54.1	48.7	59.5	Ninguno reportado
2	50.7	45.6	55.8	Ninguno reportado
3	27.0	24.3	29.7	Ninguno reportado
4	18.9	17.0	20.8	TH2B, H2BFWT
5	11.1	10.0	12.2	H4
Citoplasmática				
6	64.5	58.0	71	PDC-E2
7	51.1	46.0	56.2	E3BP
8	40.2	36.2	44.2	PDCE1 α
9	33.2	29.9	36.5	Ninguno reportado
10	26.0	23.4	28.6	Ninguno reportado
11	21.6	19.4	23.8	TH2B, H2BFWT

Como se puede ver en la tabla 10, tres de las bandas nucleares no tienen autoantígeno reportado (nuclear 1, 2 y 3). De las bandas citoplasmáticas, los antígenos probables de tres de ellas fueron identificados como mitocondriales M2 y dos no tuvieron antígenos con autoanticuerpos reportados.

Patrón definido # 2:

En ésta muestra observamos los siguientes patrones: 1) nucleares: homogéneo 1:1280 y centromérico; 2) citoplásmico: mitocondrial 1:80.

Tabla 11. Electroinmunotransferencia del patrón definido 2.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	52.5	47.2	57.8	
2	42.3	38.1	46.5	H5, macroH2A1, macroH2A2
3	38.6	34.7	42.5	macroH2A1, macroH2A2
4	14.2	12.8	15.6	H2A, H2B, H3, H1°, H1b, H3.1, H2A.X
Citoplasmática				
5	42.3	38.1	46.5	H5, macroH2A1, macroH2A2, PDC E1α

La tabla 11 resume el patrón de bandas de la muestra 12. Como se puede ver la banda nuclear 1 no tiene antígeno reportado. El patrón anti-centrómero podría estar explicado por el antígeno macroH2A1 el cual se ubica en el centrosoma [40]. El patrón mitocondrial observado y la banda citoplásmica 5 sugieren que el antígeno probable reconocido por los autoanticuerpos presentes en esta muestra es el PDCE α , antígeno mitocondrial M2.

Patrón definido #3:

Los autoanticuerpos presentes en la muestra 13 mostraron los siguientes patrones: 1) nuclear: NuMA-1 1:5120; 2) citoplásmico: mitocondrial 1:80. La tabla 12 presenta la EIT para esta muestra

Tabla 12. Electroinmunotransferencia del patrón definido 3.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	69.8	62.8	76.8	Ku, U1RNP-68
Citoplasmática				
2	75.0	67.5	82.5	PCDE-E2
3	47.0	42.3	51.7	PDC E1 α , Tubulina, Enolasa
4	43.1	38.8	47.4	PDC E1 α

Todas las bandas tienen antígeno reportado en la literatura. El reconocimiento de la tubulina podría explicar la positividad del aparato mitótico del patrón NuMA-1 observado.

Patrón definido #4:

Esta muestra presentó un patrón nuclear moteado fino con un título 1:2560. La tabla 13 muestra el patrón de bandeo observado mediante EIT.

Tabla 13. Electroinmunotransferencia del patrón definido 4.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	56.9	51.2	62.6	Ro60, Ro52
2	51.3	46.2	56.4	La
3	42.2	38.0	46.4	Ninguno reportado
4	33.2	29.9	36.5	U1RNPA, U2RNPA', hnRNPA2
Citoplasmática				
5	52.7	47.4	58.0	Ninguno reportado
6	46.8	42.1	51.5	La
7	43.2	38.9	47.5	Ninguno reportado
8	33.4	30.1	36.7	U1RNPA, U2RNPA', hnRNPA2

Los pesos moleculares de las bandas nuclear 3 y citoplasmática 7 no tienen antígeno reconocido por autoanticuerpos reportados en la literatura. Por sus pesos moleculares podría tratarse de la misma proteína presente tanto en núcleo como en citoplasma o bien del núcleo pero contaminante de la fracción citoplásmica o viceversa. La banda citoplasmática 5 tampoco tiene antígeno reconocido.

Patrón definido #5:

Esta muestra presentó un patrón nuclear moteado fino con título 1:5120 y un patrón citoplasmático > 1:5120. La tabla 14 muestra el patrón de bandas detectado mediante EIT.

Tabla 14. Electroinmunotransferencia del patrón definido 5.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	55.8	50.2	61.4	Ro60, Ro52
2	35.5	32.0	39.1	U1RNPA, U2RNPA', hnRNPA2
3	34.3	30.9	37.7	U1RNPA, U2RNPA', hnRNPA2
4	17.3	15.6	19.0	SmD
Citoplasmática				
5	75.5	68.0	83.1	U1RNP68
6	55.1	49.61	60.6	Ro60, Ro52
7	45.6	41.0	50.2	Ninguno reportado
8	34.8	31.3	38.3	U1RNPA, U2RNPA', hnRNPA2
9	24.9	22.4	27.4	Ninguno reportado

Las bandas citoplasmáticas 7 y 9 (45.6 y 24.9 kDa, respectivamente) no tienen autoanticuerpo reportado en la literatura. El análisis de peso molecular del resto de las bandas muestra proteínas que tienen autoanticuerpos reportados y cuyos patrones de IFI en células HEP-2 son moteados nucleares. El único antígeno que cuya ubicación es

tanto nuclear como citoplásmica es el Ro52, las otras proteínas encontradas en el citoplasma, que son de origen nuclear pueden ser el resultado de la contaminación de las fracciones.

Patrón definido # 6:

Los patrones de tinción observados mediante IFI fueron: 1) nucleares: moteado fino 1:1280; 2) citoplásmicos: mitocondrial 1:2560 y probable Jo-1 1:2560.

Tabla 15. Electroinmunotransferencia del patrón definido 6

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	79.4	71.5	87.3	Ku, PL7, OJ75, EJ, SRP72
2	57.5	51.8	63.3	Ro60, Ro52, SRP54
3	56.5	50.9	62.2	Ro60, Ro52, SRP54
4	45.5	41.0	50.1	La, Jo-1
5	43.9	39.5	48.3	La
Citoplasmática				
6	92.9	83.6	102.2	hAgo2
7	57.5	51.8	63.3	Ro60, Ro52, E3BP, SRP54
8	43.5	39.2	47.9	La, PDC E1 α
9	32.5	29.3	35.8	Ninguno reportado

Este suero mostró un patrón de bandeo en la que la banda citoplasmática 9 (32.4 kDa) no tiene autoanticuerpo reportado en la literatura (tabla 15). El antígeno hAgo2 podría no ser detectado en la IFI posiblemente porque el patrón mitocondrial lo oculta. Los autoantígenos que dan un patrón probable Jo-1 son: PL7, OJ75 y EJ (treonil, isoleucil, y glicil tRNA sintetasas respectivamente); y los antígenos SRP (Signal recognition particle) de 72 y 54 kDa, que también dan un patrón similar a Jo-1 [37].

Patrón definido #7:

Los patrones observados mediante IFI fueron: 1) nuclear: NuMA-1 1:2560; 2) citoplasmático: citoplásmico 1:80. Observamos además que en las células en división, en el aparato mitótico, hay estructuras con dos intensidades de fluorescencia diferente.

Tabla 17. Electroinmunotransferencia del patrón definido 7.

Banda	Peso molecular (kDa)	Peso menos 10%	Peso más 10%	Antígeno probable
Nuclear				
1	195.7	176.1	215.3	NuMA-1
2	57.6	51.8	63.4	Ro60, Ro52
3	53.3	48.0	58.6	Ro52, Tubulina
4	45.5	41.0	50.1	Tubulina, Enolasa
5	38.8	34.9	42.7	
Citoplasmática				
6	195.8	176.2	215.4	NuMA-1
7	45.1	40.6	49.6	Ninguno reportado

En esta muestra observamos una banda de 195.7 kDa en la fracción nuclear que podría corresponder al antígeno NuMA-1, la cual estuvo también presente en la fracción citoplasmática 6 (Tabla 17). La banda nuclear de 38.8 kDa no tiene antígeno probable.

A pesar de que no tuvimos en cuenta los diagnósticos de los pacientes para la selección de los sueros, una vez terminado el análisis de los resultados hicimos la revisión de los expedientes y observamos las siguientes enfermedades: síndrome de Sjögren primario (1), mielitis longitudinal (1), artritis reumatoide (1), lupus eritematoso generalizado (2), síndrome nefrótico (1), esclerosis múltiple (3), hipotiroidismo (1), hepatopatía autoinmune (1), síndrome antifosfolípido primario (1), nódulo tiroideo hiperfuncionante (1), hepatitis viral B (1), probable hipotiroidismo (1) y probable lupus eritematoso generalizado (1).

9. DISCUSION

De las 9 muestras estudiadas con patrones de IFI con características diferentes a los reportados en la literatura, 4 tuvieron tinción en vesículas en el citoplasma (muestras 1, 2, 4 y 8). Pese a que todos mostraron bandas de proteínas cuyo peso molecular no correspondía a ningún antígeno reconocido por autoanticuerpos reportados en la literatura, sólo en 3 de los casos, dichas bandas podrían estar explicando la presencia de vesículas (muestras 1, 2 y 8) ya que en la muestra número 4 la banda sin antígeno probable se presentó en el material nuclear de las células HEP-2 y no en el material citoplasmático, compartimiento en el cual se presentaba las vesículas. Sin embargo, en los casos 1, 2 y 8, no hay bandas citoplasmáticas comunes. Con lo anterior podemos decir categóricamente, que la presencia de vesículas en el citoplasma, no corresponde a un solo antígeno.

Nuestros datos sugieren que la presencia de vesículas citoplasmáticas no corresponden a un antígeno no descrito, por el patrón de bandas observado en la muestra 4, en el cual todas las bandas citoplasmáticas estuvieron reconocidas por autoanticuerpos reportados en la literatura. No descartamos la posibilidad de que las vesículas sean fragmentos de núcleo y que estén compuestas de las mismas proteínas contra las cuales van dirigidos algunos autoanticuerpos nucleares; esto porque dichas vesículas acompañan distintos tipos de patrones y porque en los 4 casos en los cuales estuvieron presentes fue posible observar reactividad contra proteínas del mismo peso molecular en las fracciones nuclear y citoplasmática.

De las 9 muestras cuyos patrones no están descritos previamente, 4 tuvieron una característica en común, nucléolos delineados, muestras 3, 5, 7 y 9. Los 4 presentaron en la EIT, bandas de proteínas cuyo peso molecular no corresponden a ningún antígeno descrito para el patrón, pero sólo en 3 casos, dichas bandas podrían estar explicando la presencia de nucléolos delineados (muestras 5, 7 y 10) ya que en la muestra 3 la banda sin antígeno probable se presentó en la fracción citoplásmica de las células HEP-2 y no en la fracción nuclear, compartimiento en el cual están los nucléolos. En las muestras 5, 7 y 10 observamos bandas nucleares sin autoantígeno descrito, las cuales corresponden a proteínas de peso molecular similar (52.3 y 53.4 kDa) para las muestras 5 y 7 respectivamente (56.3 y 52.4 kDa) para la muestra 9, lo cual sugiere que corresponde a

un antígeno común. De ser corroborado lo anterior podríamos estar describiendo un nuevo autoantígeno cuyos anticuerpos dan un patrón de tinción de nucleolos delineados. La muestra 3 reconoció una proteína de peso molecular muy parecido al de las muestras 5, 7 y 9 (51.8 kDa), no descartamos que esta banda aunque tuvo explicación para el patrón, podría estar formada por la misma proteína.

Debido a que el patrón de tinción involucra el reconocimiento de los nucléolos, el análisis de los pesos moleculares de las bandas presentes en las 4 muestras, sugiere que el antígeno blanco podría ser la proteína hU3-55 de 55 kDa. Se ha descrito que el reconocimiento de esta proteína da un patrón nucleolar (aunque no lo describen como: delineado nucleolar), lo cual podría explicar la característica de los nucléolos. Nuestro aporte en este sentido es que el reconocimiento de la proteína hU3-55 puede dar un patrón nucleolar delineado, además de un patrón agregado nucleolar mediante IFI en células HEp-2. Nuestros datos muestran también que el patrón delineado nucleolar se puede presentar junto con los autoanticuerpos que dan patrones moteados (reconocimiento de los antígenos extraíbles del núcleo) u homogéneos (reconocimiento de los componentes de la cromatina).

La muestra que presentó puntos grandes en el núcleo, junto con un patrón homogéneo, no corresponde a un antígeno contra el cual no se hayan descrito autoanticuerpos asociados, sino más bien al efecto de la suma de los anticuerpos que dan el patrón moteado (antígenos extraíbles del núcleo) y homogéneo (componentes de la cromatina).

El estudio mediante EIT de las 7 muestras con patrones típicos bien definidos mostró que el 85.7 % (6/7) tienen al menos una banda (en la fracción nuclear o citoplásmica) que no se explica por autoanticuerpos previamente reportados, con lo que podemos concluir que existen múltiples proteínas blanco de los autoanticuerpos y que muchas de ellas aún no han sido identificadas. No debemos descartar el hecho de que el reconocimiento de proteínas no reportadas como autoantígenos puede ser el resultado de las modificaciones hechas a las proteínas durante su purificación y corrimiento electroforético, por ello, en nuestras perspectivas tenemos contemplada la identificación de las proteínas para las que no encontramos reportes previos, así como de aquellas que sí han sido reportadas para confirmar su identidad.

La presencia de antígenos nucleares y citoplásmicos en las fracciones purificadas citoplásmicas y nucleares de las células HEp-2 es producto de la técnica empleada y de que dichas células son de origen neoplásico y su tasa de división es mayor que la de las células epiteliales de las cuales provienen. Durante el proceso de división celular, la membrana nuclear desaparece y la célula tiene un solo compartimiento, en el que se localizan todos los componentes celulares, lo que hace que durante la purificación sobre todo de los componentes citoplásmicos éstos estén contaminados con material nuclear. Es importante mencionar además que algunas proteínas como: Jo-1., SSa, etc. se desplazan de un compartimiento a otro en diferentes etapas del ciclo celular.

Es importante considerar que las fracciones nucleares y citoplásmicas fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturizantes, por tanto, hay pérdida de epítopes conformacionales [42], con lo que la EIT no permite la detección de los autoanticuerpos que reconocen dichos epítopes.

Los autoanticuerpos presentes en los pacientes con enfermedades autoinmunes pueden reconocer epítopes que comparten diferentes antígenos y con ello dar reacciones cruzadas con proteínas nucleares y citoplásmicas. Tomando en cuenta lo anterior las conclusiones del presente trabajo se hicieron con cautela y son una propuesta para realizar estudios con mayor número de muestras, con pacientes bien caracterizados clínicamente y empleando técnicas depuradas de purificación de proteínas.

La sensibilidad de detección de ciertas proteínas no se vio afectada por el título de autoanticuerpos presentes en los sueros, ya que todas las muestras incluidas en el presente trabajo tenían títulos de autoanticuerpos $\geq 1:1280$, pero sí por la cantidad de proteína de determinados antígenos específicos presentes en las células en condiciones nativas; tal es el caso de las vesículas citoplásmicas, que pese a estar bien definidas no son muy numerosas y al purificar las fracciones citoplásmicas su representación en el total de las proteínas pudiera ser muy baja y no obstante la alta sensibilidad de la EIT pudieran no ser suficiente para evidenciar la presencia de los autoanticuerpos presentes en las muestras.

No obstante que el personal que lee las IFI está altamente calificado y que cuenta con

una amplia experiencia, debe tomarse en cuenta que la interpretación de algunos patrones tiene un cierto grado de subjetividad, por eso tuvimos en cuenta la opinión de más de un experto, para la clasificación y definición de los patrones.

Es posible que algunas bandas correspondan a proteínas para las cuales se han descrito, recientemente presencia de autoanticuerpos [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49] , sin embargo, no las incluimos como autoantígenos por no tener la descripción del patrón de IFI en células HEp-2.

Es importante mencionar que en todos nuestros ensayos de EIT tuvimos una banda inespecífica, cercana a la β -galactosidasa (PM = 100 kDa), que no pudimos eliminar, dicha banda nos impidió determinar si existían proteínas de ese peso molecular que hubieran sido reconocidas por las muestras de los patrones definidos o por las de los patrones problema.

Finalmente queremos resaltar el hecho de que no se conoce todo acerca de los anticuerpos antinucleares presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes, incluidos aquellos con patrones típicos de IFI en células HEp-2. Para los estudiosos de estos autoanticuerpos existe aun mucho camino por andar.

10. CONCLUSIONES

Las proteínas de las vesículas citoplasmáticas reconocidas por autoanticuerpos no corresponden a un antígeno común para las cuatro muestras que las presentaron.

Los autoanticuerpos presentes en los sueros que dan una tinción intensa en la periferia del nucleolo (nucleolar delineada) reconocen una proteína común, de 55kDa, dicha proteína podría ser un autoantígeno no descrito, para la tinción nucleolar.

Las vesículas citoplasmáticas y los nucleólos delineados están presentes tanto en patrones homogéneos como moteados.

Aún los sueros de patrones definidos sin características atípicas, reconocen proteínas para las cuales no se ha descrito presencia de autoanticuerpos en la literatura.

Es evidente la necesidad de estudios con mayor número de muestras de pacientes bien caracterizados clínicamente y técnicas depuradas de purificación de proteínas para confirmar los resultados.

No todo está escrito acerca de los autoanticuerpos anti-nucleares, para los estudiosos del tema, aún queda mucho camino por recorrer.

11. ANEXOS

Anexo 1. Amortiguador A: Solución hipotónica para la obtención de núcleos.

Compuesto	Concentración final
HEPES pH 7.9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1.5 mM
H ₂ O	cbp
DTT	1 mM

Anexo 2. Amortiguador C: Solución hipertónica de alta fuerza iónica par obtención de proteínas nucleares

Compuesto	Concentración final
HEPES pH 7.9	20 mM
NaCl	0.4 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Glicerol	25%
EDTA	0.2 mM
H ₂ O	cbp
DTT	1 mM
PMSF	0.5 mM

Anexo 3: Algunos de los autoantígenos descritos en la literatura

Patrón	Antígeno	Peso molecular (kDa)	Observaciones
HOMOGENEO	H2A	14	
	H2B	13.8	
	H3	15.3	
	H4	11.3	
	H1	23	
	H5	43	Esta en citoplasma [40].

	H2A.X	15.1	
	macroH2A1	39.6	
	macroH2A2	40.1	
	CENP-A	17	
	H1t	22	
	TH2B	19.6	
	H2BFWT	19.6	
	Sc170	70	Subunidad de la topoisomerasa I (que pesa 105 kDa).
CENTROMERICO	CENPA	17 (16)	
	CENPB	80 (65)	
	CENPC	140	
	CENPE	316	
	CENPF	367	
MOTEADO	U1RNP-68	68	
	U1RNP-A	34	
	U1RNP-C	23	
	Sm B'/B	29/28	
	Sm D	16	
	Sm E	12	
	Sm F	11	
	Sm G	10	
	U2RNPA'	32	
	U2RNPB''	28	
	hnRNPA2	36	
	Ro60	60	SS-A de 60 kDa
	Ro52	52	SS-A de 52 kDa
	La	47	SS-B
NUCLEOLAR	Mpp10	79	Es un U3RNP
	hU3-55	55	Es un U3RNP
	Imp3	22	
	Imp4	34	
	Fibrilarina	34	
	Th/ To	40	7-2 RNP/ 8-2 RNP
	NOR 90	90/92	
	RNA helicasa	100	

	B23	37	No 38
MITOCONDRIAL	PDC-E2	70	Subunidad de 2-oxo-ácido deshidrogenasa.
	E3BP	54	Dihidrolipoamide dehydrogenase (E3) binding protein
	PDC E1 α	43	Subunidad del complejo piruvato deshidrogenasa.
RIBOSOMAL	P0	38	
	P1	19	
	P2	17	
ANTI-Jo-1	Jo-1	50	Histidil-tRNA sintetasa.
	PL7	80	Treonil-tRNA sintetasa.
	PL12	110	Alanil-tRNA sintetasa.
	OJ	150	Isoleucil-tRNA sintetasa. OJ es realmente un complejo.
		170	
		130	
		75	
	EJ	75	Glicil-tRNA sintetasa.
KS	65	Asparagil-tRNA sintetasa.	
SRP, similar a Jo-1	SRP	72	SRP: Signal recognition particle.
		68	
		54	
		19	
		14	
		9	
ANTI-GOLGI	Golgi-67	67	
	Golgi-97	97	
ANTI-ENDOSOMA	EEA1	162	[38]
	CLIP170	170	[38]
ANTI-GW182	GW182	182	Cuerpos ricos en

			glicina(G) y triptofano(W) [41].
	hAgo2	≈ 97	Es componente de los cuerpos GW [41].
ANTI- APARATO MITOTICO	Tubulina	50	
NuMA-1	NuMA-1	210	
NuMA-2	HsEg-5	130	
CENTRIOLAR	Enolasas 1, 2 y3.	46-47	
ANTI-CITOESQUELETO	Actina	42	Es un microfilamento.
	Vementina	53	Es un filamento intermedio.
ANTI-SS56	SS56	56	[50]

9. REFERENCIAS

1. Huamanchumo, R. et al. 2002. La reumatología y el reumatólogo. Diagnóstico. 41(3). pp.:116-123.
2. Cardiel, M. 2005. Epidemiología general de las enfermedades reumáticas y su repercusión socioeconómica. En: Molina, J. Fundamentos de Medicina, Reumatología, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas. Sexta edición. pp.: 57-62.
3. James JA, Harley JB, Scofield RH. 2006. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 18(5): 462-467.
4. Abu-shakra, M. et al. 2001. Cancer and autoimmunity: autoimmune and rheumatic features in patients with malignancies. *Ann Rheum Dis.* 60: 433-440.
5. As W. 2005. Antinuclear antibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory disease. *Scand J Rheumatol.* 34: 260-268.
6. Harley J, James, J. 2006. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull Hosp Jt Dis.* 64 (1-2):45-50.
7. Binder S, et al. 2005. Computer-assisted pattern recognition for autoantibody results. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12 (12): 1353-1357.
8. Binder S. 2006. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus.* 15: 412-421.
9. Arcave M, Orfus G. 2006. Prevalence of antinuclear envelope antibodies and their isotypes in sera positive for antinuclear antibodies. *Medicina (Buenos Aires).* 66(4):327-331.
10. Tonuttia E, et al. 2004. Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity.* 37(2): 171-176.
11. Damoiseaux J, Cohen J. 2005. From ANA to ENA: How to proceed?. *Autoimmun Rev.* 5(2006): 10-17.
12. Renato T, et al. 2002. Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Test in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases. *Am J Clin Pathol.* 117: 316-324.

13. Cohen P. 2003. Systemic Autoimmunity. EN: Paul. Fundamental Immunology. U.S.A. Lippincott Williams & Wilkins. pp.:1371-1399.
14. Molina J. 2005. El laboratorio en reumatología. Fundamentos de Medicina, Reumatología, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas. Sexta edición. pp.: 70-88.
15. Haugbro K, et al. 2004. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis.* 63: 386-394.
16. Rouquette A, Desgruelles C. 2006. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. *Lupus.* 15: 403-407.
17. Van Bavel C, et al. 2007. Anti-nucleosome autoantibodies. En: Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.:197-203.
18. Villalta D, Tozzoli R. 2007. Anti-chromatin (Nucleosome) autoantibodies. En: Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.:141-149.
19. Amoura, Z. et al. 1994. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice with proteinuria. *Arthritis Rheum.* 37(11): 1684-1688.
20. Gutierrez A, et al. 2006. Diagnostic value of anti-nucleosome antibodies in the assessment of disease activity of systemic lupus erythematosus: a prospective study comparing anti-nucleosome with anti-dsDNA antibodies. *J Rheumatol.* 33(8): 1538-1544.
21. Gonzales C, et al. 2004. Anti-nucleosome, anti-chromatin, anti-dsDNA and anti-histone antibody reactivity in systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med.* 42(3): 266-272.
22. Dumortier H, Muller S. 2007. Histone autoantibodies. En: Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.:169-176.
23. Sarzi-Puttini P. et al. 2005. Drug-induced lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 38(7): 507-518.
24. Mchugh Neil. Centromere autoantibodies. 2007. En: Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 151-157.
25. Bellando S, et al. 2007. Topoisomerase-I (Scl-70) autoantibodies. En: Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 231-238.

26. Zhuang H, et al. 2007. Ku and Ki autoantibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.:177-184.
27. Tsuneyo M. 1999. Atlas of antinuclear antibodies. Segunda edición. MBL. pp.:23.
28. Reichlin M, HAL S. 2007. SS-A (Ro) autoantibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 225-230.
29. Routsias J, TZIOUFAS, Athanasios. 2007. SS-B (La) autoantibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 239-246.
30. Goto N, et al. 2006 Anti p80 coilin autoantibodies react with a conserved epitope and are associated with anti-DFS70/LEDGF autoantibodies. Autoimmnu. 26(1): 42-51.
31. Sabine O, et al. 2007. Antinucleolar antibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 135-139.
32. Pollard M, Hultman P. 2007. Fibrillarlin autoantibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 317-323.
33. Mccarty G. 2007. Proliferating cell nuclear antigen autoantibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.:205-210.
34. Pietro I, Józefa W. 2007. Nuclear envelope proteina autoantibodies/anti-lamin autoantibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.:191-196.
35. Inverzzini P, et al. 2007. Antimitochondrial antibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 473-477.
36. Zandman G, Shoenfeld Y. 2007. Anti-ribosomal antibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 217-223.
37. Targoff I. 2007. Myositis autoantibodies: aminoacyl-tRNA synthetase, signal recognition particle, Mi-2, and PM-Scl autoantibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 577-589.
38. Fritzler M, Chan E. 2007. Golgi complex and endosome antibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 263-270.
39. Aoki C, Bowlus C. 2007. Cytoskeletal autoantibodies/ anti-actin antibodies. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 309-316.
40. www.hprd.org. Human Proteín Reference Database. Consulta de enero 12 de 2007.
41. Fritzler M, Chan E. 2007. GW bodies, P bodies and components of the miRNA pathway. En:Yehuda S. Autoantibodies. Italy, ELSEVIER, pp.: 257-262.

42. Salonen E, et al. 2004. Anti-telomere antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE): a comparison with five antinuclear antibody assay in 430 patients with SLE and other rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 63(10): 1250-1254.
43. Ganapathy V, et al. 2003. LEDGF/p75: a novel nuclear autoantigen at the crossroads of cell survival and apoptosis. *Autoimmun Rev.* 2(5): 290-297.
44. Stea E, et al. 2007. Analysis of parotid glands of primary Sjögren's syndrome patients using proteomic technology reveals altered autoantigen composition and novel antigen targets. *Clin Exp Immunol.* 147(1): 81-89.
45. Fujita Y, et al. 2006. Proteomics-based approach identifying autoantibody against peroxiredoxin VI as a novel serum marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 12(21): 6415-6420.
46. Satoh T, et al. 2005. Novel autoantibodies against 7SL RNA in patients with polymyositis/dermatomyositis. *J. Rheumatol.* 32(9): 1727-1733.
47. Lawand M, et al. 2004. Alpha-fodrin autoantibodies are reliable diagnostic markers for juvenile and adult Sjögren's syndrome. *Egypt J Immunol.* 11(1): 75-81.
48. Provedello DM, et al. 2005. Relevance of high Ki 67 in pituitary adenoma. Case report and review of literature. *Neurosurg Focus.* 15; 19(5):E11.
49. Johannes H, Irun C. 2007. p53 autoantibodies. In: Yehuda S. *Autoantibodies.* Italy, ELSEVIER, pp.: 271-276.
50. Billaut O, et al. 2001. SS-56, a novel cellular target of autoantibody responses in Sjögren syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 108(6): 861-869.