



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD – BIOQUÍMICA CLÍNICA

***CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MARCAJE POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE  
TRANSMISIÓN DE PATRONES MOTEADO GRUESO Y MOTEADO FINO; EXPRESADOS  
POR AUTOANTICUERPOS PRESENTES EN UN GRUPO DE PACIENTES CON  
DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES***

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO EN:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**QFB. ROCIO TORRICO LAVAYEN**

**TUTOR:**

**DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**MÉXICO, D.F. MARZO DEL 2015**



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: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

Secretario: DR. JESÚS ANGEL ARENAS ALATORRE

Vocal: DR. LUÍS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

1<sup>er</sup>. Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

2<sup>do</sup> Suplente: DRA. MARIA ELENA SOTO LÓPEZ

Lugares donde se realizó la tesis:

INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN  
FACULTAD DE CIENCIAS-LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA  
(TLAHUIZCALPAN)

**TUTOR DE TESIS:**

DR. LUÍS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

-----

**FIRMA**

## Agradecimientos

“Somos la suma de nuestro entorno....

....y es por Dios que estamos aquí “

Por lo que quiero agradecer al Dr. Luis Felipe Jiménez García por su disposición y paciencia en la dirección de ésta tesis.

De igual manera al Dr. Carlos Núñez Alvares por el apoyo y acceso al laboratorio de Inmunología, a la M. en Cs. Reyna Lara Martínez por el apoyo técnico en el laboratorio de microscopía electrónica. Gracias también a los miembros de ambos equipos por acogerme y orientarme.

A los compañeros y amigos de trabajo, por su apoyo a lo largo de éstos años.

A mi esposo e hijas por acompañarme, entenderme, alentarme y apoyarme en los momentos de flaqueza.

A la memoria del Dr. Javier Cabiedes, quien supo sembrar en sus colaboradores y alumnos la necesidad de saber más.

Gracias de verdad a todos.

<b>Contenido</b>	<b>Pag.</b>
1.Índice de abreviaturas	5
2.Resumen	7
3.Introducción	8
4.Marco Teórico	9
4.1. Enfermedades Autoinmunes y Autoanticuerpos	9
4.2. Determinación de AAN	10
4.2.1. Inmunofluorecencia Indirecta	13
4.2.2.Patrones de Inmunofluorescencia	13
4.3.Factores de <i>splicing</i>	16
4.4.El proceso de <i>splicing</i> y las enfermedades	20
5.Planteamiento del problema	22
6.Justificación	23
7.Hipótesis	25
8.Objetivos	26
8.1.Objetivo principal	26
8.2.Objetivos secundarios	26
9.Material y Métodos	27
9.1.Sujetos de Estudio	27
9.2.Métodos	27
9.2.2.Determinación de la presencia de AAN mediante inmunoensayo de absorción ligado a enzimas (ELISA)	27

9.2.3.Purificación de Anticuerpos	28
9.2.4.Inmunomarcaje de células HEp-2 mediante MET	28
9.2.4.1.Cultivo línea celular	28
9.2.4.2. Procesamiento de células HEp-2 para microscopia electrónica	28
9.2.4.2.1.Morfología	28
9.2.4.2.2.Inmunomicroscopía electrónica	28
9.2.5.Análisis estadístico	28
10.Resultados	29
10.1.Frecuencia de patrones en la población a estudiar	29
10.2.Concomitancia de patrones de interés con diversos patrones	29
10.3.Características demográficas de la submuestra seleccionada	30
10.4.Distribución de patologías de la submuestra seleccionada	31
10.5.Distribución de Patrones MG y MF en submuestra	32
10.6.Distribución de Patologías según Patrón de IFI	33
10.7.Distribución de Anticuerpos según Patrón	33
10.7.Descripción de los patrones a través de inmunomarcaje mediante MET	34
11.Discusión y Conclusiones	46
12.Perspectivas y Recomendaciones	49
12.Anexos	50
13.Bibliografía	54

## 1. Índice de Abreviaturas

AA	Autoanticuerpos
AAN	Anticuerpos Antinucleares
ATCC	Colección Americana de Cultivos
BCA	Ácido bicinconínico
CENP A-E	Centrómero Proteína A-E
CENTRI	Patrón Centriolar
CENTROM	Patrón Centromérico
CFS	Cúmulo de Factores de <i>Splicing</i>
CGI	Cúmulo de Gránulos Intercromatinianos
CIT	Citoplásmico
CREST	Calcinosis, Síndrome de Raynaud, Dismotilidad esofágica, Esclerodactilia, Telangiectasia
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNACd	Ácido desoxiribonucleico bicatenario
DRMTMOS	Dermatomiositis
EA	Enfermedad Autoinmune
EIT	Ensayo por Electroinmunotransferencia
ELISA	Inmunoensayo Ligado a Enzima
EMTC	Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo
ES	Escleroderma
FI	Patrón Filamentos Intermedios
FP	Fibras Pericromatinianas
GI	Gránulos Intercromatinianos
H	Patrón Homogéneo
HEPAUT	Hepatitis Autoinmune
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
hnRNP	Ribonucleoproteína Heterogénea Nuclear
HPT	Hipotiroidismo
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
Jo-1	Anticuerpo anti-Histidil ARNt transferasa
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MF	Moteado Fino
MG	Moteado Grueso
MIT	Patrón Mitocondrial
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
pCoilin	Proteína específica de los cuerpos de Cajal
PEROX	Patrón Peroxisomal
PITSLRE	Proteincinasa p58
PM	Polimiositis
PP	Fosfoproteinfosfatasa
Pre-mRNA	Ácido Ribonucleico pre-mensajero
RIA	Radio Inmuno Análisis
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA pol II	Polimerasa II del Ácido Ribonucleico
RNP/Sm	Complejo

Scl-70	Ribonucleoproteínas/Sm(U1RNP/Sm)
SC35	Anticuerpo contra Topoisomerasa I
Sm	Anticuerpo contra Factor de <i>Splicing</i> SC35
snRNP	Antígeno Smith
SPSS	Ribonucleoproteinas pequeñas nucleares
SR	Statistical Product and Service Solutions
SRPK1	Serina-Arginina
SSA	Proteincinasa de residuos SR
SSB	Antígeno asociado a Síndrome de Sjögren A
tRNA	Antígeno asociado a Síndrome de Sjögren B
To	Ácido Ribonucleico de Transferencia
	Anticuerpos contra RNAsa P



## 2. Resumen

Las enfermedades autoinmunes (EA) son trastornos que implican una respuesta inmunitaria contra autoantígenos, traducida en producción de anticuerpos antinucleares (AAN) los que inicialmente se identifican mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), para posterior confirmación de especificidad. La IFI valora los AAN mediante la marcación fluorescente de subestructuras blanco detectados con microscopio de fluorescencia de baja resolución. Nuestro objetivo fue el de marcar por inmunomicroscopía electrónica patrones definidos por IFI como Moteado Grueso (MG) y Moteado Fino (MF), debido a la ambigua definición de éstos. Con este objetivo se caracterizó la especificidad de anticuerpos presentes en muestras clasificadas como MG y MF, se purificó y se los proceso para inmunomicroscopía electrónica. De 1,430 muestras, seleccionamos 34 con dilución  $>1:640$ , provenientes de pacientes con edad de  $47.7 \pm 14.6$  y de sexo femenino en 88% de los casos. Las EA más frecuentes fueron escleroderma limitada (30%), lupus eritematoso sistémico (21%), cirrosis biliar primaria (15%), síndrome de Sjögren (9%).

La especificidad de anticuerpos, en suero, mostró diferencias significativas para anticuerpos anti-RNP y anti-Sm, cuando se realizó la clasificación de los sueros mediante IFI.

Mediante microscopía electrónica, los sueros reprodujeron la marcación del anticuerpo control (SC35) de fibras y gránulos caracterizados además por tinción preferencial como fibras pericromatinianas y gránulos intercromatinianos. Se observó también marcación en nucléolo, en ambos grupos, lo que difiere de la definición propuesta, por ciertos grupos, de la clasificación por IFI en MG y MF. Esta situación, en conjunto con la presentación similar de especificidad de anticuerpos y la presencia de anticuerpos anti DNA y anti nucleosomas, nos lleva a concluir que no se justifica la clasificación de

los patrones en MF y MG, así como tampoco el restringir la investigación de anticuerpos sólo a aquellos relacionados a factores de *splicing*.

### **3. Introducción**

Las enfermedades autoinmunes (EA) se definen como patologías multifactoriales asociados al fracaso de la autotolerancia y la consiguiente respuesta inmune contra antígenos propios o autólogos<sup>1</sup> y la consiguiente producción de autoanticuerpos (AA), cuya identificación resulta importante para el diagnóstico temprano y oportuno de las EA<sup>2,3</sup>.

La identificación de autoanticuerpos se realiza mediante diversos métodos, entre los cuales la inmunofluorescencia indirecta (IFI) es el más empleado en el laboratorio clínico, pues constituye un método de tamizaje de AA, en el que su presencia genera patrones resultantes de la marcación de las distintas estructuras celulares contra los cuales van dirigidos los AA<sup>3,4</sup>.

Entre los diferentes patrones de IFI el denominado patrón moteado, con sus variantes moteado grueso (MG) y moteado fino (MF), posee una definición poco clara debido a las diferentes subestructuras marcadas y a la resolución del microscopio de fluorescencia creando confusión en su identificación e interpretación<sup>4</sup>.

El presente trabajo tiene como objetivo el uso de MET para la observación de las subestructuras blanco de AA presentes en suero de pacientes con EA que hayan generado patrones MG y MF por IFI, con el empleo de un mismo sustrato antigénico: células HEp-2, con el objeto de tener una definición más clara y precisa de estos patrones, así como su relación con AA presentes en pacientes con EA.

## **4. Marco Teórico**

### **4.1. Enfermedades Autoinmunes y Autoanticuerpos**

Las enfermedades autoinmunes (EA) se definen como patologías secundarias al fracaso de la autotolerancia y la consiguiente respuesta inmunitaria contra antígenos propios o autólogos<sup>1</sup>. Las causas de dicha falla no han sido del todo dilucidadas; pero se han identificado ciertos factores que podrían participar en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (EA), como son: genéticos, hormonales, envejecimiento, deficiencia de inmunoglobulinas, infecciones, factores ambientales y de antigenicidad cruzada<sup>2, 5</sup>.

Se han reportado diversas asociaciones entre la presencia de autoanticuerpos, denominados de manera general anticuerpos antinucleares (AAN), y ciertas EA<sup>5</sup> lo cual ha contribuido a que algunos de estos AAN sean considerados como marcadores diagnósticos de EA, tal es el caso de los anticuerpos anti-DNA nativo y anti-Smith (Sm) para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES), anti-Scl-70 para escleroderma (ES) difusa; anticuerpos anticentrómero para ES limitada o frecuentemente asociada al síndrome de CREST (acrónimo inglés de calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia, telangiectasia) y anti RNAt-sintetasa para dermatomiositis-polimiositis<sup>6</sup>. Lo anterior pone de relieve que la determinación de AAN en el laboratorio clínico, resulte de suma importancia para el diagnóstico de diferentes patologías autoinmunes.

## 4.2. Determinación de AAN

### 4.2.1 Inmunofluorecencia Indirecta

Entre los diversos métodos para la identificación de AAN, la IFI con empleo de células en monocapa provenientes de carcinoma laríngeo como sustrato, (HEp-2 del inglés *Human Epithelial type 2*) fue considerada, durante algunas décadas, como el estándar de oro para el diagnóstico de EA<sup>7, 8, 9 10</sup>.

Entre las ventajas de esta técnica podemos citar:

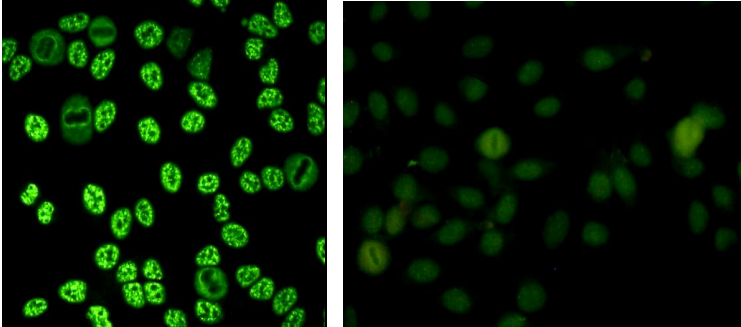
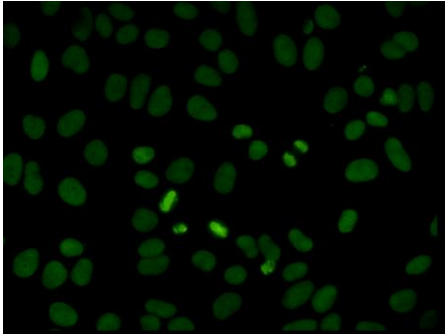
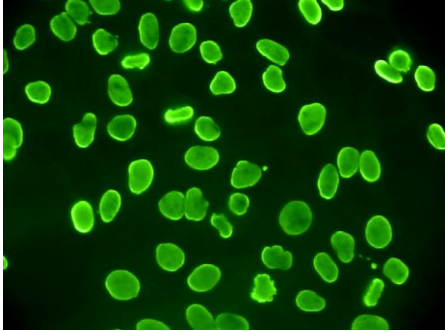
1. Mayor especificidad debido al origen humano de las células vs cortes de tejido animal.
2. Las células poseen un núcleo grande.
3. Presencia simultánea de diversos estadios celulares.
4. Distribución uniforme de antígenos
5. Ausencia de matriz extracelular.

Los AAN generan, en dichas células, una serie de patrones de fluorescencia según la estructura contra la cual van dirigidos, constituyéndose así en un método de tamizaje para la búsqueda de AA<sup>7</sup>: (Cuadro 1 y 2)

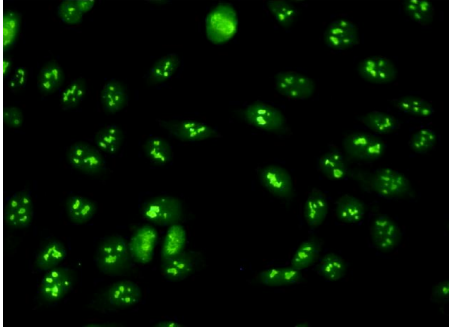
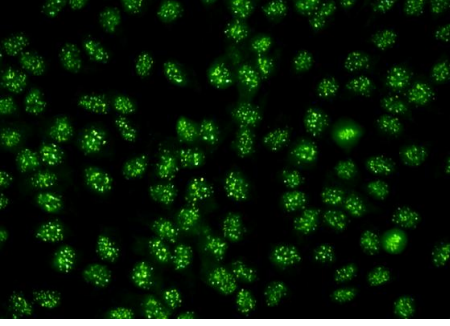
Patrones comunes de IFI para AAN asociados con patologías específicas		
Patrón AAN	Antígeno	Patología Asociada
Moteado	ENA, RNP, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1, Proteína P ribosomal.	LES, EMTC, ES, SS primario, PM.
Homogéneo	DNAcd, Nucleosomas, Histonas	LES, LES inducido por medicamentos.
Periférico (anular)	DNAcd, RNP, Sm, SSA/Ro	LES, ES.
Nucleolar	PM-Scl, RNA polimerasa I-III, U <sub>3</sub> -RNP, To, RNP	ES, PM
Centrómero	CENP A-E	ES

**Cuadro 1:** Modificado de Kumar *et al. Diagnostic Pathology* 2009 4:1 doi:10.1186/1746-1596-4-1<sup>11</sup>

ENA: antígenos extraíbles del núcleo, RNP: ribonucleoproteínas, Sm: antígeno Smith, SSA:antígeno asociado a síndrome de Sjögren A, SSB: antígeno asociado a síndrome de Sjögren B, Scl-70: AAN contra Topoisomerasa I, Jo-1: Anticuerpo anti-Histidil ARNt transferasa, LES:lupus eritematoso sistémico, EMTC:enfermedad mixta de tejido conjuntivo, SS: síndrome de Sjögren, PM: polimiositis, DNAcd: ácido de desoxiribonucleico de bicatenario, RNP: Ribonucleoproteína, ES:escleroderma, To: anticuerpos contra RNAsa.

Patrones comunes de IFI para AAN asociados con Patologías			
Patrón AAN	Antígeno	Patología Asociada	IFI
<b>Moteado</b>	ENA, RNP, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1, Proteína P ribosomal.	LES, EMTC, ES, SS primario, PM.	
<b>Homogéneo</b>	DNAcd, Nucleosomas, Histonas	LES, LES inducido por medicamentos.	
<b>Periférico (anular)</b>	DNAcd, RNP, Sm, SSA/Ro	LES, ES.	

## Patrones comunes de IFI para AAN asociados con Patologías

<p><b>Nucleolar</b></p>	<p>PM-Scl, RNA polimerasa I-III, U<sub>3</sub>-RNP, To, RNP</p>	<p>ES, PM</p>	
<p><b>Centromérico</b></p>	<p>CENP A-E</p>	<p>ES</p>	

**Cuadro 2:** Modificado de Kumar *et al. Diagnostic Pathology* 2009 4:1 doi:10.1186/1746-1596-4-1.<sup>11</sup>

ENA: antígenos extraíbles del núcleo, RNP: ribonucleoproteínas, Sm: antígeno Smith, SSA: antígeno asociado a síndrome de Sjögren A, SSB: antígeno asociado a síndrome de Sjögren B, Scl-70: AAN contra Topoisomerasa I, Jo-1: Anticuerpo anti-Histidil ARNt transferasa, To: anticuerpos contra RNAsa P, LES: lupus eritematoso sistémico, EMTC: enfermedad mixta de tejido conjuntivo, SS: síndrome de Sjögren, PM: polimiositis, DNACd: ácido de desoxiribonucleico de bicatenario, RNP: Ribonucleoproteína, ES: escleroderma.

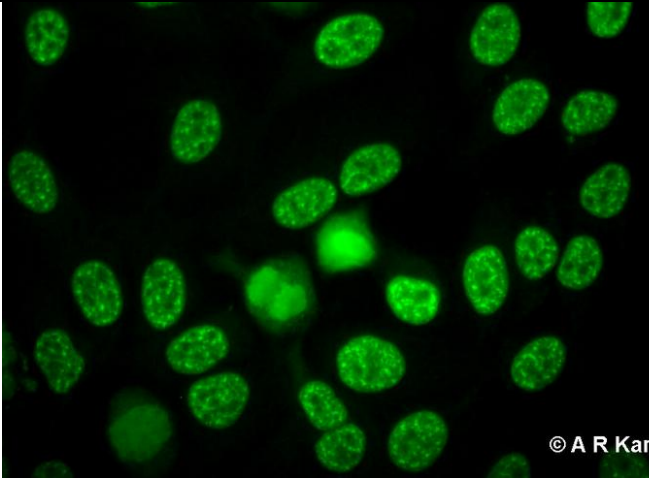
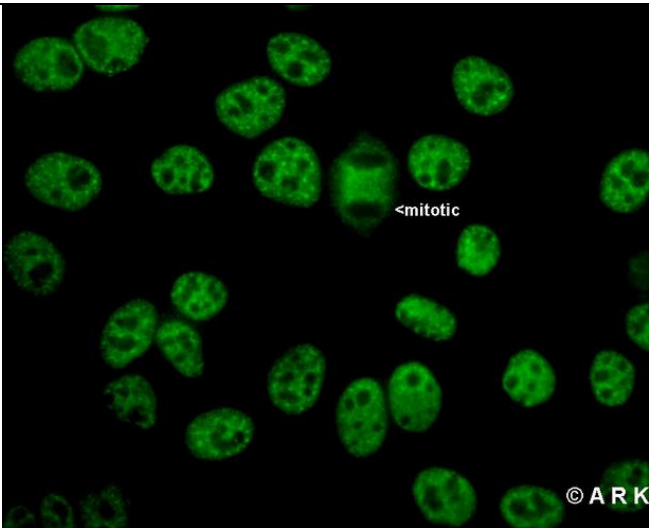
La principal desventaja del empleo de IFI con células HEp-2 como sustrato radica en su baja especificidad, debido a su baja resolución. Lo que obliga al clínico a recurrir a métodos de mayor especificidad para la búsqueda, confirmación y cuantificación de los AAN encontrados<sup>4</sup>.

Recurriendo a métodos como: inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), electroinmunotransferencia (EIT), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo en línea, etc.<sup>6, 8</sup>.

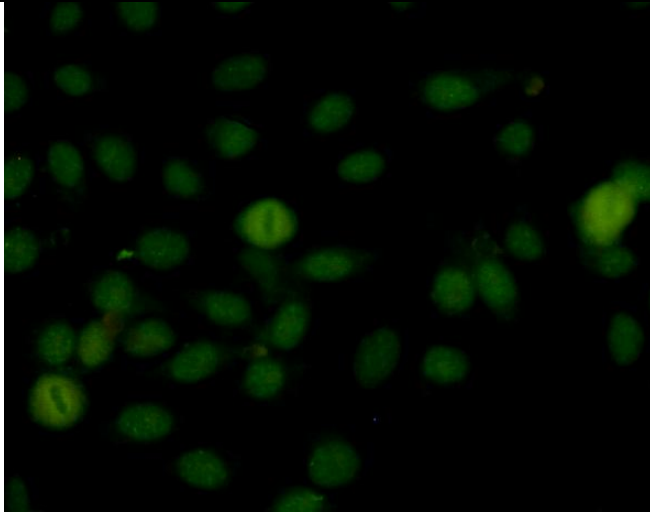
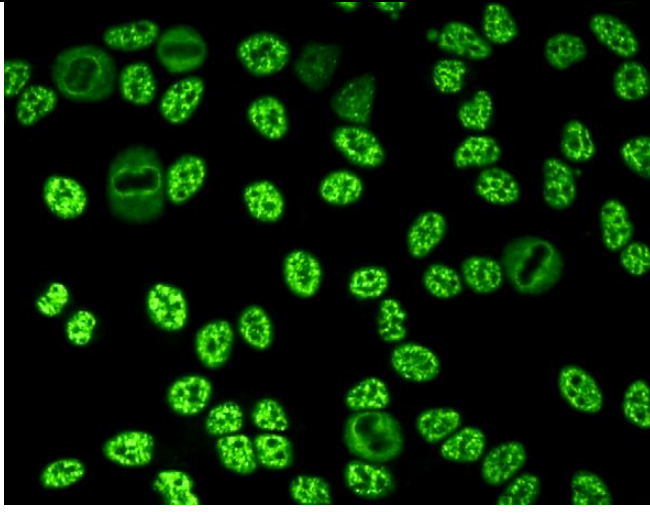
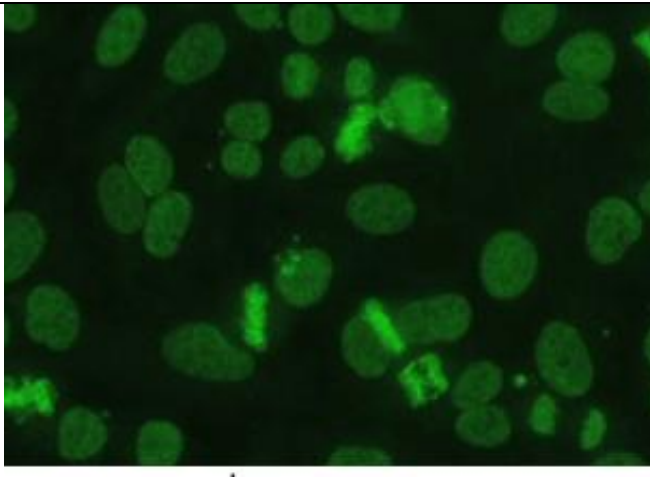
#### 4.2.2 Patrones de Inmunofluorescencia

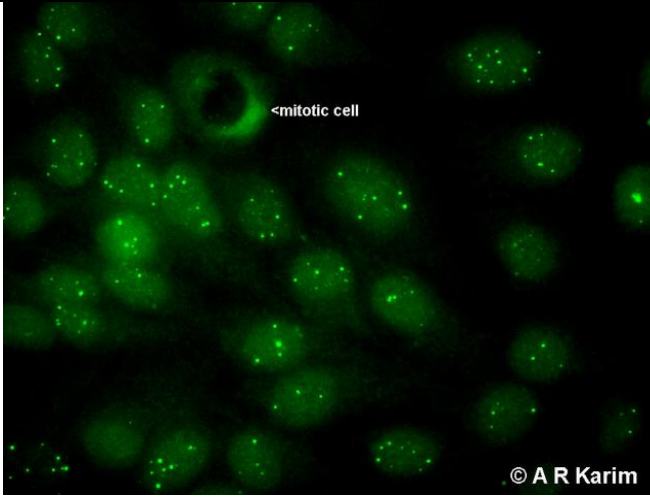
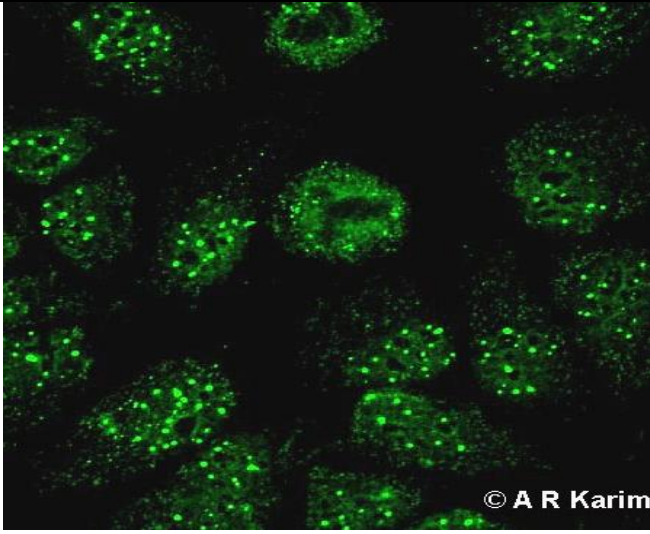
Dentro de la amplia descripción de patrones identificados mediante IFI-HEp-2, el patrón moteado, originalmente se describió como: “*presencia de puntos fluorescentes en el nucleoplasma, expresados por la presencia de AA contra proteínas nucleares*”<sup>6</sup>

En la actualidad el avance tecnológico en el análisis bioquímico, ha ampliado esta descripción inicial, en un intento de hacer evidente la presencia de los componentes de las subestructuras marcadas, mediante IFI, dando origen así a diversas definiciones de éste<sup>9,10,12</sup>, las cuales se ilustran en el Cuadro 3.

Patrón Moteado			
<b>Moteado Granular</b>	hnRNP	LES, EMTC, AR, ES	
<b>Moteado Grueso (a)</b>	Sm, U1-snRNP, U2-snRNP, U4/U6-snRNP	LES, EMTC, F. de Raynaud, Psoriasis, SS, ES	



<p><b>Moteado Grueso (b)*</b></p>	<p>snRNP, SSA, SSB</p>	<p>EMTC, LES, SS, AR, síndrome de superposición.</p>	
<p><b>Moteado Fino</b></p>	<p>Mi-2, SSA/Ro,SS B/La, RNAPol-II</p>	<p>DMTMOS, SS, LES, ES</p>	
<p><b>Moteado Fino Denso ©</b></p>	<p>DFS-70</p>	<p>Personal de laboratorio sin EA</p>	

<p><b>Moteado discreto(6-10) nuclear</b></p>	<p>Mi-2 Pcoilin-80</p>	<p>CBP, Hepatitis crónica activa</p>	
<p><b>Motas/gotas nucleares múltiples</b></p>	<p>Sp-100</p>	<p>CBP, SS, LES</p>	

Cuadro 3: Modificado de HEp-2 Image library: <http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity/liver-associated-antibodies/index.aspx><sup>9</sup>

a) Definición Universidad de Birmingham<sup>9</sup>

b) Definición de Cabiedes. J. et al, Reumatol Clin.; 2009<sup>10</sup>.

c) Tomado de Buchner, C., Bryant, C., Eslami, A., Lakos, G. Anti-Nuclear Antibody Screening Using HEp-2 Cells. *J. Vis. Exp.* (88), e51211, doi: 10.3791/51211; 2014<sup>12</sup>.

hnRNP: Ribonucleoproteína heterogénea nuclear, snRNP: Ribonucleoproteína pequeña, RNP: ribonucleoproteína, Sm: antígeno Smith, SSA: antígeno asociado a síndrome de Sjögren A, SSB: antígeno asociado a síndrome de Sjögren B, Scl-70: Topoisomerasa I, LES:lupus eritematoso sistémico, EMTC:enfermedad mixta de tejido conjuntivo, SS: síndrome de Sjögren, , ES: escleroderma, RNAPol-II: enzima polimerasa II del ácido ribonucleoproteico, DFS-70:motas finas no densas-70 , Mi2: helicasa de DNA con cromodominio de unión a proteína 4.

La descripción que hace la literatura de estos subtipos de patrón moteado se enumera a continuación:

- a. Patrón moteado granular: caracterizado por la presencia de puntos fluorescentes de tamaño variable en todo el nucleoplasma, sin tinción de la cromatina en la fase de división del ciclo celular. Asociado principalmente con el reconocimiento de ribonucleoproteínas heterógenas nucleares (hnRNP)<sup>7</sup>.

- b. Patrón moteado grueso: en el que se observa el núcleo teñido con gránulos finos o gruesos, nucléolos teñidos con diversa intensidad y las células en metafase sin tinción. Asociado con ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs), principalmente U1-snRNP<sup>8,9</sup>.
- c. Patrón moteado fino: núcleo teñido con gránulos finos o gruesos, nucléolos negativos a la tinción, al igual que las células en metafase. Ha sido asociado a la presencia de anticuerpos anti-U1 RNP (de 68, 34 y 23 kD), anti-Sm (proteínas U1, U2, U4/U6 y U5) componentes de Sm B'/B (29kD/28kD), D (16kD), E (12kD), F (11kD) y G (10kD), U2RNP, U1U2RNP, hnRNP, SS-A/Ro<sup>7,9</sup>.
- d. Patrón moteado fino denso: La inmunofluorescencia se muestra con gránulos finos o densos distribuidos de manera difusa en el nucleoplasma, además de puntos localizados en la placa de la cromatina en la fase mitótica, asociado a la presencia de anticuerpos anti-DFS70<sup>12</sup>.
- e. Patrón punteado nuclear: escasas motas (<6) en el núcleo interfásico, frecuentemente asociado a tinción nuclear granular y/o tinción nucleolar. Asociado a la proteína de 80kDa denominada p80-coilina<sup>9,11</sup>.
- f. Patrón punteado nuclear: abundantes motas (>6) de tamaño variable, dispersas sobre el núcleo pero separadas de los nucléolos y que se localizan en la periferia nuclear durante la mitosis. Este patrón está asociado al reconocimiento de la proteína nuclear de 100kDa denominada Sp-100<sup>11</sup>.

Los patrones anteriormente descritos se han reportado como presentes en diversas EA sistémicas y se han asociado bioquímicamente a factores que intervienen en el procesamiento del pre-RNA mensajero (pre-mRNA) denominado *splicing*.

### **4.3. Factores de *Splicing***

Muchos genes eucarióticos se encuentran interrumpidos por secuencias no codificantes denominadas intrones. El transcrito primario es procesado para remover estas secuencias no codificantes y unir las secuencias codificantes (exones) en una molécula de RNA continua, antes de que el precursor del RNA mensajero (pre-mRNA) sea transportado del núcleo al citoplasma, donde se traduce<sup>13</sup>.

El *splicing* del pre-mRNA por lo tanto es un proceso biológico fundamental en células eucarióticas que sucede principalmente en forma co-transcripcional<sup>13, 14</sup>. En el proceso están involucrados un gran número de factores y pueden dividirse conceptualmente en dos etapas distintas<sup>15, 16,17</sup>.

- a) Reconocimiento de la secuencia intrónica conservada cerca del sitio de corte 5' y región de *branchpoint* por un grupo de factores de *splicing*; seguido por el ensamble del spliceosoma, en donde ocurren rearrreglos acompañados de 2 pasos químicos de remoción del intrón. En este primer paso se generan dos intermediarios: el exón 1 liberado y el lazo o lariat-exón 2.
- b) En la segunda etapa, el exón 1 ataca el sitio de *splicing* 3' para generar los productos del *splicing*: exones 1 y 2 liberados y el intrón en forma de lazo. Los dos pasos catalíticos se llevan a cabo en el complejo C del spliceosoma.

La remoción de intrones y ligado de exones resultante es catalizado por partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNPs) y por factores de *splicing* que no forman snRNP. Los RNAs producidos durante la transcripción por la RNA polimerasa II (RNAPol II) contienen secuencias conservadas en los sitios de *splicing* 5' y 3' y una región conservada cerca del sitio de *splicing* 3' llamada punto de ramificación "branchpoint". Estas secuencias conservadas son reconocidas por los snRNP (U1, U2, U4, U5, U6) y factores esenciales de *splicing* no-snRNP cuando se ensamblan en el pre-mRNA para formar el spliceosoma<sup>17</sup>.

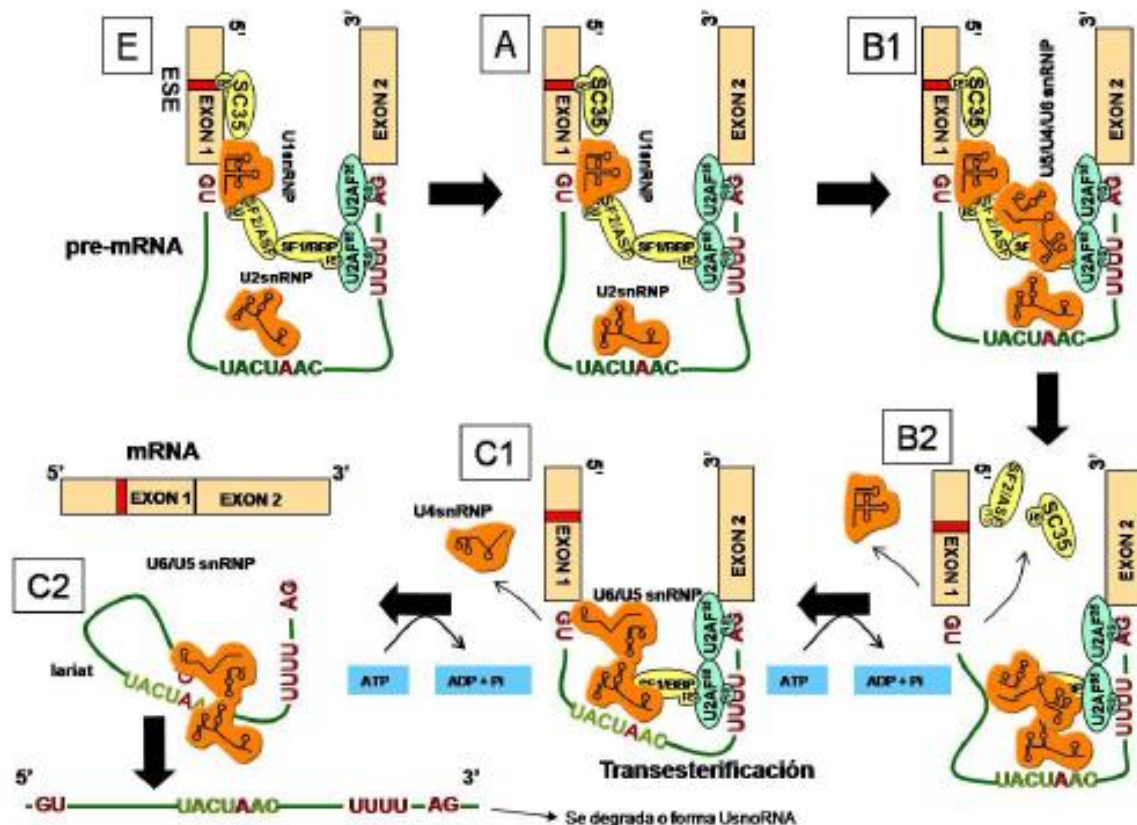
La interacción altamente organizada de los RNAs y proteínas permite a la maquinaria de *splicing* que los intrones del pre-mRNA sean eliminados de forma correcta. Una familia de factores de *splicing*, denominados proteínas SR, debido a sus repeticiones múltiples de serina y arginina, se encuentra involucrada en dicho mecanismo a través de sus motivos altamente conservados de reconocimiento del RNA y del dominio SR<sup>18</sup>.

Los motivos de reconocimiento para el RNA se unen a sus secuencias de RNA de manera coordinada, para determinar la eficiencia del *splicing* y comprometer a los pre-mRNA en el evento de *splicing*<sup>19</sup>.

Los dominios SR median interacciones de tipo proteína-proteína en el ensamble del spliceosoma<sup>18, 19</sup>. Los factores SR: SF2/ASF, se encuentran involucrados en la selección del sitio de *splicing* 5' y 3' de los pre-mRNA con *splicing* alternativo, y SC35 puede encontrarse relacionado con la fase temprana del ensamble del spliceosoma, así como en el reclutamiento de factores cruciales de elongación transcripcional<sup>20</sup> (Cuadro 4).

Las macromoléculas involucradas en los procesos de producción, transporte, regulación y coordinación de RNA se encuentran compartimentalizadas en dominios reconocibles. En el caso del pre-mRNA estos compartimentos se encuentran como cúmulos de gránulos intercromatinianos (CGI), en forma de fibras pericromatinianas (FP) y cuerpos de Cajal.

Los CGI son estructuras irregulares que miden entre 0,3 a 1,8  $\mu\text{m}^{21}$  y están compuestos por numerosos gránulos intercromatinianos (GI) de 20-25 nm<sup>22, 23</sup>, que a su vez pueden estar interconectados por fibrillas de 9-10 nm<sup>22</sup>.



**Cuadro 4. Biología celular del *splicing*:** El *splicing* ocurre de manera secuencial en varios pasos en el spliceosoma (complejos E→A→B1→B2→C1→C2). Los factores no snRNPs (U2AF<sup>65/35</sup>, verde), proteína SR (amarillo) –ambas con el dominio RS– y los factores snRNP (naranja), participan en el reconocimiento y acercamiento de los sitios de unión intrón-exón, para que ocurran los pasos de transesterificación (Tomado de Jiménez García et al., 2007)<sup>23</sup>

Los GI son ricos en:

- Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP) y factores de *splicing* no ribonucleoproteicos pertenecientes a la familia de proteínas SR.
- RNA poli (A) y proteína II enlazada a Poli (A)

Los CGI son sitios de almacenaje y/o modificación de los factores de *splicing*, aunque este proceso no se realice dentro de ellos.

Las fibras pericromatinianas (FP) se localizan sobre los CGI, en la cromatina condensada o en forma difusa a través del nucleoplasma. La maduración del pre-mRNA se da en forma simultánea a la transcripción. Ultraestructuralmente las proteínas hnRNPs hicieron evidente que se agregan a las fibras de manera co-transcripcional<sup>24</sup>. Los factores de *splicing* se asocian también a las FP cuando se empiezan a formar y se liberan una vez que se ha completado el proceso de maduración<sup>25</sup>. Una de las funciones propuestas, de las FP, es el empaquetamiento del transcrito en una fibra y posteriormente en un gránulo de RNP lo cual parece asegurar el transporte eficiente. Los componentes proteicos y el RNA que conforman el gránulo están organizados en forma dependiente de secuencia de RNA, de manera que cuando la tira de RNP se pliega, los gránulos adquieren una forma característica. La molécula de RNA está organizada de una manera específica en el gránulo, exponiendo secuencias que participarán en interacciones moleculares<sup>25, 26</sup>.

Los cuerpos de Cajal (CC) o cuerpos espiralados, son cuerpos nucleares altamente conservados en plantas y animales. Varían de tamaño (0,2-0,5  $\mu\text{m}$ ) y número (1-10) en distintos tipos celulares y condiciones de crecimiento. Contienen antígenos nucleolares (fibrilarina, Nopp140), snRNPs del *splicing*, auto antígeno humano p-80 coilina, así como diversas cinasas; pero no se ha encontrado evidencia de que contengan rRNA, pre-mRNA, DNA, ni factores de *splicing* no-snRNP. Por estas características, los CC no parecen ser sitios de *splicing* o producción de ribosomas, encontrándose evidencias de que estarían involucrados en la modificación inicial y montaje de varios U snRNPs<sup>27</sup>.

A diferencia de los extensamente caracterizados mecanismos moleculares y bioquímicos, su caracterización ultraestructural es menos entendida. El estudio del mecanismo de mantenimiento de estos compartimentos nucleares propone que las

motas (CGI) son reflejo de la actividad transcripcional y de *splicing*. Siendo el patrón moteado, un reflejo del estado constante de asociación/disociación de factores de *splicing* entre el nucleoplasma y los CGI<sup>17</sup>. En una célula transcripcionalmente activa, los genes están asociados con la periferia de los CFS, es decir: CGI, FP. El RNA es madurado en los sitios de transcripción y liberado rápidamente. Posterior a la inhibición de la transcripción, los factores de *splicing* se acumulan en los CFS alejados de genes. Finalmente, cuando se provoca sobreexpresión génica en la célula o los genes contienen gran cantidad de intrones, pueden ser liberados de los sitios de transcripción y se mueven alrededor de los CFS<sup>24, 28</sup>.

#### **4.4. El proceso de *splicing* y las enfermedades**

Diversos estudios han sugerido cambios en la morfología de las motas o *speckles* según la actividad transcripcional<sup>28</sup>, tipo celular, respuesta al estímulo hormonal<sup>29</sup>; así como modificaciones en el *splicing* del mRNA en distintas patologías humanas<sup>27</sup>.

Se han observado incrementos en la expresión individual de los factores de *splicing* del tipo SR produciéndose, como resultado, proteínas que podrían emplearse como marcadores de enfermedad, debido a los cambios de actividad sufridos durante la patogénesis asociados con enfermedad<sup>30,31</sup>.

Los principales antígenos, relacionados al proceso de *splicing* del pre-mRNA, que han sido asociados a EA y han sido identificados inicialmente gracias a su expresión como patrones moteados mediante IFI, se encuentran resumidos en el cuadro 2<sup>8,9</sup>.

<b>Antígenos Asociados a EA y Patrones Expresados</b>		
<b>Patología</b>	<b>Antígeno (factor de <i>Splicing</i> involucrado)</b>	<b>Patrón IFI Asociado</b>
<b>LES</b>	Sm	Moteado grueso nuclear
	U1-snRNP	Moteado grueso nuclear
	SS-A	Moteado fino nuclear
	SS-B	Moteado fino nuclear
	RNPribosomal	Nucleolar homogéneo más citoplásmico denso
	hnRNP-A1	Motas nucleares largas
<b>ES</b>	RNA-polimerasa I	Moteado nuclear
	RNA-polimerasa II	Moteado nuclear más cromatina homogénea en metafase
	U1 snRNP	Moteado grueso nuclear
	NOR	Moteado nucleolar
<b>SS</b>	SS-A	Moteado fino nuclear
	SS-B	Moteado fino nuclear
	NOR	Moteado nucleolar
	Ki/SL	Moteado nuclear
<b>Polimiositis/ Dermatomiositis</b>	Mi-2	Moteado fino nuclear
	SS-A	Moteado fino nuclear
	SS-B	Moteado fino nuclear
<b>AR</b>	RNP	Moteado grueso
	SSA/SSB	Moteado fino

**Cuadro 5:** Tomado de Bradwell A, Stokes R, Meed G.; *Advanced atlas of autoantibody patterns*. Birmingham, England: The Binding Site Ltd.; 1999<sup>8</sup>. Image library: <http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity><sup>9</sup>. LES: lupus eritematoso sistémico, Sm: antígeno Smith, U1-snRNP: ribonucleoproteína pequeña nuclear uridinada 1, Síndrome de Sjögren, RNPribosomal: ribonucleoproteína ribosomal, hnRNP-A1: ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1, ES: escleroderma, RNA-polimerasa I: enzima polimerasa del ácido ribonucleico I, RNA-polimerasa II: enzima polimerasa del ácido ribonucleico II, NOR: región organizadora del nucléolo, Ki/SL: proteína nuclear grande (345 , 395 kDa) expresada durante fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M), Mi-2: enzima implicada en la remodelación de nucleosoma, AR: artritis reumatoide.



## **5. Planteamiento del Problema.-**

La amplia prevalencia de AAN, su detección mediante IFI, así como su asociación con diversas EA, se ve reflejada en diversos estudios. La definición de los patrones de fluorescencia, con el avance de la biología molecular, ha intentado puntualizar la presencia de anticuerpos contra ultraestructuras específicas, sin evidencias morfológicas contundentes de que dichas descripciones vayan a contribuir en la interpretación de las IFI y por lo tanto en el diagnóstico de las EA.

El empleo extendido de IFI en el laboratorio de reumatología se debe -además de su accesibilidad y sencillez- a su alta sensibilidad. Para dotar de mayor especificidad a éste método, creemos adecuado revisar la definición de los patrones, cada vez más diversos, a través de un método que permita marcar puntualmente las subestructuras contra las cuales parecen dirigirse los anticuerpos, esto con la resolución que requieren para su marcación. Con este fin proponemos el empleo de inmunomarcaje mediante microscopia electrónica de transmisión cuya resolución permitirá la observación de las estructuras celulares blanco de los AAN.

La caracterización morfológica e inmunológica de autoanticuerpos, nos permitirá la caracterización de patrones de IFI: MG y MF, expresados por AAN presentes en pacientes con EA.

## 6. Justificación

La prevalencia de los patrones moteados - MG y MF - reportada en distintos estudios varía según la población y la patología. Wananakul y colaboradores<sup>32</sup> en un estudio realizado en población infantil tailandesa sana, reporta la expresión del patrón moteado, en el 20% de la población estudiada. Así mismo, Hoffman<sup>33</sup> reporta un 35% de casos calificados como moteado o *speckled*, en pacientes referidos al área de reumatología, en población Belga. Otro estudio en 150 pacientes uruguayos con sospecha de LES realizado por Carpinelli<sup>34</sup> reportó una frecuencia de 12% de patrón puntillado grueso y 26% de puntillado fino con un pronóstico poco favorable, al menos en el patrón fino. A su vez, Marin<sup>35</sup> y colaboradores reportaron una prevalencia del 50-55% para el patrón moteado en pacientes con lupus o AR; 20 a 63 % en personal sano de hospitales y 50.3% en individuos sanos en población mexicana.

Como se puede apreciar en los casos presentados, el patrón moteado, no solo tiene una presencia importante y variable; sino también una denominación distinta sin mencionar, en ninguno de los estudios, los criterios para la definición y evaluación del patrón de interés.

La descripción original realizada por Burnham<sup>36</sup>, que define al patrón moteado como *“numerosos puntos uniformes y diminutos dispersos a través de la fluorescencia; esparcidos a nivel de la periferia de los núcleos y sus márgenes”*; ha sufrido una serie de modificaciones y redefiniciones con el aporte de los avances de la biología molecular. Con el propósito de simplificar las definiciones dadas por la literatura y casas proveedoras<sup>8, 9, 12</sup>, Cabiedes<sup>10</sup> y colaboradores proponen una definición sustentada en la diferencia de reactividades que muestran los sueros que expresan los patrones MG y MF. El patrón MG es definido como aquel con tinción positiva del núcleo con gránulos finos o gruesos, nucléolos teñidos y placa de cromatina en células en división sin teñir, es decir, no hay reconocimiento de los componentes de la cromatina. En contraste, el patrón MF, se caracteriza por tinción del núcleo con gránulos finos o gruesos, nucléolos negativos a la tinción al igual que la placa de cromatina en células en división<sup>10</sup>.

Los diversos estudios en que se reportan la prevalencia de estos patrones no especifican la definición empleada al momento de calificar los patrones expresados. Pero si muestran variaciones en la frecuencia de estos en distintas patologías y poblaciones<sup>6, 32, 33, 34, 35</sup>.

El dotar de validez y robustez a los métodos analíticos de aplicación clínica contribuye a incrementar la confiabilidad del médico en el laboratorio clínico, permitiendo la realización de un diagnóstico oportuno, tratamiento efectivo y seguimiento adecuado del paciente.

## **7. Hipótesis.-**

El inmunomarcaje celular, mediante microscopia electrónica de transmisión, permitirá realizar la descripción de los patrones calificados como MG y MF por IFI, así como determinar si hay diferencias entre ellos.

## **8. Objetivos.-**

### **8.1. Objetivo principal:**

- Establecer criterios clave para la calificación objetiva de patrones de inmunofluorescencia -MG y MF- expresados por AAN, a través de su caracterización por técnicas de inmunomarcaje para microscopia electrónica de transmisión.

### **8.2. Objetivos secundarios:**

- Caracterizar serológicamente a los AAN relacionados con patrones MG y MF.
- Aplicar el inmunomarcaje mediante MET con el empleo de AAN provenientes de pacientes con diagnóstico de EA.
- Determinar la concordancia entre las definiciones de patrones MG y MF, para microscopia de fluorescencia y las subestructuras marcadas mediante microscopia electrónica.

## **9. Materiales y Métodos**

### **9.1 Sujetos de estudio**

Se obtuvieron sueros de pacientes referidos al Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), con solicitud para la determinación de AAN mediante IFI, con expresión de patrones Moteado Grueso o Moteado Fino a diluciones superiores o iguales a 1:640. De los cuales se confirmó el diagnóstico de EA mediante revisión de expedientes por un reumatólogo adjunto al departamento, según criterios del Colegio Americano de Reumatología.

El suero de estos pacientes se congeló y separó hasta su uso, descartándose aquellos con diluciones inferiores a las especificadas o cuyo diagnóstico no corresponda a EA.

### **9.2. Métodos**

#### **9.2.1 Tamizado inicial mediante IFI con células HEp-2, como sustrato**

El procedimiento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (The Binding Site) y certificación ISO 9001-2008 (Ver anexo al final).

#### **9.2.2 Determinación de anticuerpos específicos mediante inmunoensayo de absorción ligado a enzimas (ELISA)**

La determinación de especificidad de anticuerpos se realizó en equipos automatizados: DSX System y Alegria, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (DYNEX Technologies, The Binding Site y/u Orgentec) (Ver Anexo al final).

No se cuenta con valores de referencia propios para anticuerpos contra ribonucleoproteínas y/o moléculas relacionadas, por lo que éstos son tomados de los sugeridos por las casas comerciales.

### **9.2.3. Purificación de anticuerpos**

La purificación de inmunoglobulinas se realizó mediante cromatografía de afinidad con proteína G (columna comercial Prosep G-Millipore), siguiendo las especificaciones del fabricante (Ver anexo al final).

### **9.2.4. Inmunomarcaje de células HEp-2 mediante MET**

**9.2.4.1. Cultivo de línea celular** derivada de carcinoma epidermoide de laringe humano (HEp-2; ATCC: CCL-23); cultivadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, siguiendo recomendaciones para su conservación y cultivo (Ver anexo al final).

#### **9.2.4.2. Procesamiento de células HEp-2 para microscopia electrónica**

Las células cultivadas fueron procesadas para:

**9.2.4.2.1 Morfología;** para la verificación de integridad así como para el reconocimiento ultraestructural de las células sustrato (HEp-2), mediante la aplicación de la técnica convencional para MET, con adecuaciones al tipo de muestra (Ver anexo al final).

**9.2.4.2.2 Inmunomicroscopía Electrónica,** para la localización de antígenos celulares blanco de autoanticuerpos presentes en pacientes y marcados con anticuerpo secundario marcado con partículas de oro coloidal (10nm). (Ver anexo al final).

### **9.2.6. Análisis estadístico**

Debido a las características de la muestra y las variables estudiadas, los resultados fueron analizados con el empleo de la prueba exacta de Fischer, con un nivel de significancia  $\alpha < 0.05$ . Para ello se empleó el programa Epi Info<sup>TM</sup> 7 y SPSS (Statistical Product and Service Solutions), en su versión 18.0.

## 10. Resultados

### 10.1. Frecuencia de patrones en la población a estudiar

De un total de 1,430 muestras recibidas para la determinación de AAN, el 36% expresó patrón moteado grueso y 26% patrón moteado fino (Cuadro 6).

Frecuencia de Patrones Expresados		
Patrón	Frecuencia	Porcentaje
H	415	29.02
<b>MG</b>	<b>515</b>	<b>36.01</b>
<b>MF</b>	<b>373</b>	<b>26.08</b>
Nucleolar	90	6.29
Periférico	12	0.84
NuMA	21	1.47
Scl-70	3	0.21
PCNA	1	0.07
Total	1430	

**Cuadro 6:** H: homogéneo, MG: moteado grueso, MF: moteado fino, NuMA: aparato mitótico nuclear, Scl-70: Topoisomerasa I, PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

### 10.2. Concomitancia de otros patrones con el patrón de interés

En el caso del patrón calificado como MG el 70% de los casos presentaba la expresión de hasta tres patrones concomitantes y 11% del total de MG sumaron 30 posibles combinaciones diferentes de baja frecuencia (0,17-0,91). En cuanto al MF, aproximadamente el 67% presentó entre 2 y 4 patrones simultáneamente y un 5% dieron 14 combinaciones diferentes de baja frecuencia (0,27-0,8%) (Cuadro 7).



Frecuencia de Patrones MG/MF y Combinaciones					
Moteado Grueso	n	%	Moteado Fino	n	%
MG,CIT	123	20.43	MF,CIT	116	29.52
<b>MG</b>	<b>118</b>	<b>19.60</b>	<b>MF</b>	<b>107</b>	<b>27.23</b>
MG,CIT,FI	100	16.61	MF,CIT,FI	49	12.47
MG,FI	18	2.99	MF,CIT,MIT	20	5.09
MGMIT	18	2.99	MF,MIT	16	4.07
MG,CIT,MIT	15	2.49	MF,FI	13	3.31
MG,CENTO,CIT	11	1.83	MF,CENTI	7	1.78
MG,CIT,GOLGI	10	1.66	MF,PCOILLIN,CIT,MIT	6	1.53
MG,CENTO	10	1.66	MF,CENTI,CIT	5	1.27
MG,CENTO,MIT	6	1.00	MF,PCOILLIN,MIT	5	1.27
MG,CIT,LISO	6	1.00	MF,CITO,HUSO	5	1.27
MG,PCOILLIN	6	1.00	MF,CIT,PEROX	4	1.02
30COMBINACIONES (0.17-0.91)	60	11.74	14 COMBINACIONES (0.27- 0.8)	20	5.36

**Cuadro 7:** MG: moteado grueso, MF: moteado fino, CIT: citoplásmico, FI: filamentos intermedios, MIT: mitocondrial, CENTO: centromérico, GOLGI: aparato de Golgi, LISO: lisosomal, PCOILLIN: proteína Coillín, CENTI: centriolar, HUSO: huso cromosómico, PEROX: peroxisomal.

### 10.3. Características demográficas de la submuestra seleccionada

Del total de muestras positivas que cumplieron con los criterios de selección, señalados en el método, se obtuvo una muestra final de 34 pacientes. Las características demográficas del grupo de análisis, indican que el 88.2% está conformada por sexo femenino y 11.8% masculino, existiendo una relación femenino: masculino de 8:1.

La edad media fue de 47.7 años, con un rango de 18-80 años.

En cuanto a la distribución de género según el patrón MG y MF, 5.3% de los casos de MF corresponden al género masculino y 94.7% al femenino. En cuanto al MG 20% corresponden al género masculino y 80 al género femenino (cuadro 8).

Frecuencia de Patrón por Género		
Patrón/Género	Masculino	Femenino
<b>MF</b> <b>(n=19)</b>	1 (5.3%)	18 (94.7%)
<b>MG</b> <b>(n=15)</b>	3 (20%)	12 (80%)
P	NS	NS

**Cuadro 8:** MF: moteado fino, MG: moteado grueso

#### 10.4. Distribución de patologías de la submuestra seleccionada

En cuanto al diagnóstico de los pacientes seleccionados, se observó que el 31.4% tuvieron el diagnóstico de escleroderma limitada (ESL), 20% correspondieron a lupus eritematoso sistémico (LES), 14.3% a cirrosis biliar primaria (CBP), 8.6% presentaron síndrome de Sjögren y hepatitis autoinmune (HEPAUT), 5.7% de los casos presentaron enfermedad mixta de tejido conjuntivo (EMTC) y dermatomiositis (DRMTMOS) y 2.9% a escleroderma difusa (ESD) e hipotiroidismo (HPT) (cuadro 9).

Frecuencia de Patologías		
	Frecuencia	Porcentaje
ESL	10	29.4
LES	7	20.6
CBP	5	14.7
SS	3	8.8
HEPAUT	3	8.8
EMTC	2	5.9
DRMTMOS	2	5.9
HPT	1	2.9
ESD	1	2.9
Total	34	100.0

**Cuadro 9.** ESL: escleroderma limitada, LES: lupus eritematoso sistémico, CBP: cirrosis biliar primaria, SS: síndrome de Sjögren, HEPAUT: hepatitis autoinmune, EMTC: enfermedad mixta del tejido conjuntivo, DRMTMOS: dermatomiositis, HPT: hipotiroidismo, ESD: escleroderma difusa.

### 10.5. Distribución de Patrones MG y MF en submuestra

En cuanto a la distribución de patrones expresados por las muestras seleccionadas observamos que 43%, es decir 15 casos, presentan patrón MG y 57%, 19 casos, patrón MF.

Estos patrones presentan a su vez patrones concomitantes. En el caso de MF el patrón citoplásmico (CIT) es concomitante en 53% de los casos, mitocondrial (MIT) 15.8%, centriolar (CENTRI) 5.3%. Cabe mencionar que MF no se presenta en ningún caso en forma individual. En el caso de MG el 38% presenta concomitancia con patrón citoplásmico y 40% con patrón centromérico, 33% con patrón mitocondrial y 6.7% con Jo-1, el patrón MG no se presenta en forma individual (Cuadro 10).

<b>Patrones Concomitantes con MF y MG</b>					
<b>Patrón</b>	<b>CIT</b>	<b>MIT</b>	<b>CENTROM</b>	<b>CENTRI</b>	<b>Jo-1</b>
<b>MF (n=19)</b>	10 (52.6%)	3 (15.8%)	0 (0%)	1 (5.3%)	0 (0%)
<b>MG (n=15)</b>	6 (37.5%)	5 (33%)	6 (40%)	0 (0%)	1 (6.7%)

**Cuadro 10.** MF: moteado fino, MG: moteado grueso, CIT: citoplásmico, MIT: mitocondrial, CENTROM: centromérico, CENTRI: centriolar, Jo-1: anti-Histidil ARNt transferasa

La concomitancia del patrón centromérico con el patrón MG presentó diferencia significativamente estadística con el patrón MF ( $p=0.003$ )

## 10.6. Distribución de Patologías según Patrón de IFI

Patologías Presentes según Patrón									
	LES	EMTC	SS	DRMTOS	CBP	HPTO	HEPAUT	ESL	ESD
<b>MF</b> Recuento	7	2	3	2	2	1	1	1	0
<b>(n=19)</b> % de MF	36.8%	10.5%	15.8%	10.5%	10.5%	5.3%	5.3%	5.3%	.0%
<b>MG</b> Recuento	0	0	0	0	3	0	2	9	1
<b>(n=15)</b> % de MG	0%	0%	0%	0%	20.0%	0%	13.3%	60.0%	6.7%
<b>p</b>	0.01	0.43	0.23	0.43	0.63	1	0.57	0.001	1

**Cuadro 11.** MF: moteado fino, MG: moteado grueso, ESL: escleroderma limitada, LES: lupus eritematoso sistémico, CBP: cirrosis biliar primaria, SS: síndrome de Sjögren, HEPAUT: hepatitis autoinmune, EMTC: enfermedad mixta del tejido conjuntivo, DRMTOS: dermatomiositis, HPT: hipotiroidismo, ESD: escleroderma difusa

Analizando los patrones en función de las patologías presentes (cuadro 11), podemos observar que existen diferencias significativas en la expresión de patrones. Es el caso de aquellas muestras provenientes de pacientes con diagnóstico de LES que representaron el 37% de los casos de MF y el 100% de los casos de LES ( $p=0.01$ ). En cuanto a MG podemos ver que el 60% de los casos provinieron de pacientes con diagnóstico de ESL, lo cual representa el 90% de pacientes con dicho diagnóstico ( $p=0.001$ ).

## 10.7. Distribución de Anticuerpos según Patrón de IFI

En cuanto a la determinación de especificidad de cada uno de los patrones de interés, en el caso de los sueros que expresaron patrón MF (19) el 78.2% presentó anticuerpos contra SSA, 57.9% contra nucleosoma, 36.8% contra RNP/Sm, 31.6% contra Sm, 26.3% contra SSB, 10.5% contra Scl-70 y DNACd. En cuanto a los sueros que expresaron patrón MG (15), 46.7% de los casos resultaron positivos para SSA y CENT-B, 26.7% para nucleosomas, 13.3% para SSB y DNACd (cuadro 12).

Anticuerpos Presentes según Patrón								
	CENT-B	DNA	Nucleosoma	RNP/Sm	Sci-70	Sm	SSA	SSB
<b>MF (n=19)</b>	1 (5.3%)	2 (10.6%)	11 (57.9%)	7 (36.8%)	2 (10.5%)	6 (31.6%)	15 (78.2%)	5 (26.3%)
<b>MG (n=15)</b>	7 (46.7%)	2 (13.3%)	4 (26.7%)	0	0	0	7 (46.7%)	2 (13.3%)
<b>p</b>	0.011	NS	NS	0.011	NS	0.024	NS	NS

**Cuadro 12.** MF: moteado fino, MG: moteado grueso, CENT-B: centrómero B, DNA: ácido desoxirribonucleico, RNP/Sm: ribonucleoproteínas/Smith, SSA: síndrome de Sjögren A, SSB: síndrome de Sjögren B.

Aplicando la prueba de Exacta de Fisher podemos decir que hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de MG y MF para los anticuerpos anti RNP/Sm ( $p=0.011$ ) y Sm ( $p=0.024$ ). Se observa también diferencia significativa para anticuerpo anticentrómero. Los demás anticuerpos no presentan diferencias significativas entre grupos, observándose una tendencia en el caso de SSA, en relación al MF ( $p=0.07$ )

### 10.8 Descripción de los patrones a través de inmunomarcaje mediante MET

Las células procesadas para MET convencional, mostraron buena conservación ultraestructural. En la figura 1a, se observa una célula en la que pueden apreciarse el citoplasma con orgánulos bien conservados (retículo endoplásmico, mitocondrias y núcleo). El segmento de núcleo se observa claramente delimitado a través de envoltura nuclear.

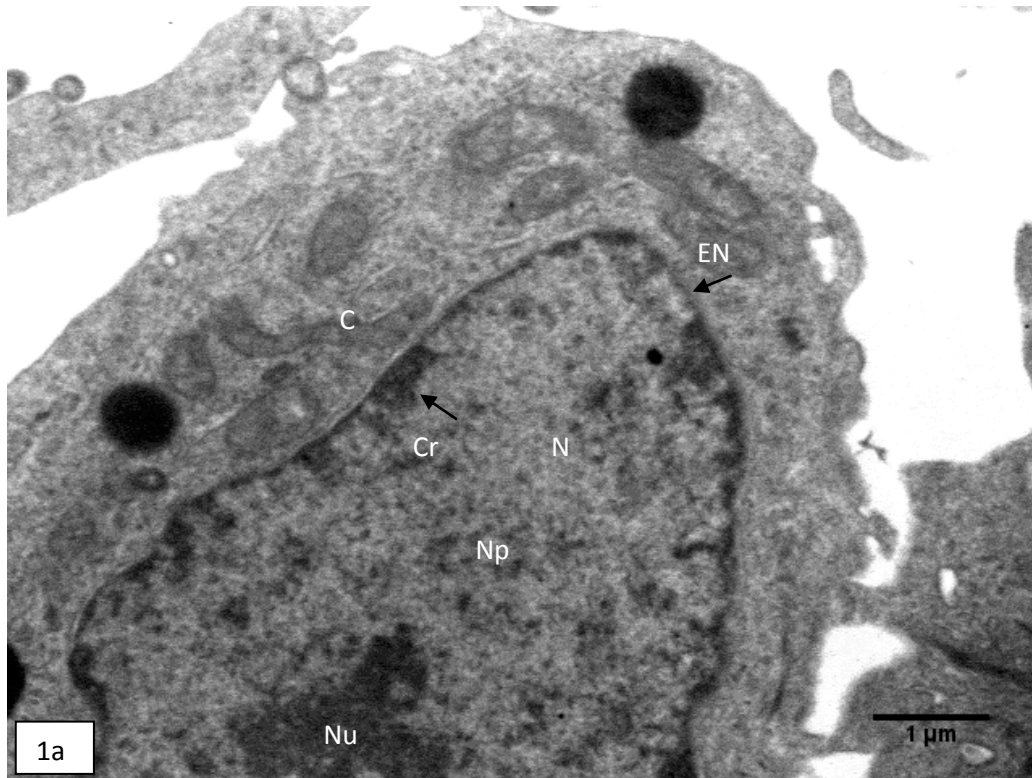


Figura 1a: Ultraestructura de células HEp-2, procesadas para MET convencional a) núcleo (N), citoplasma (C), cromatina (Cr), nucléolo (Nu), nucleoplasma (Np), envoltura nuclear (EN) (10,000x).

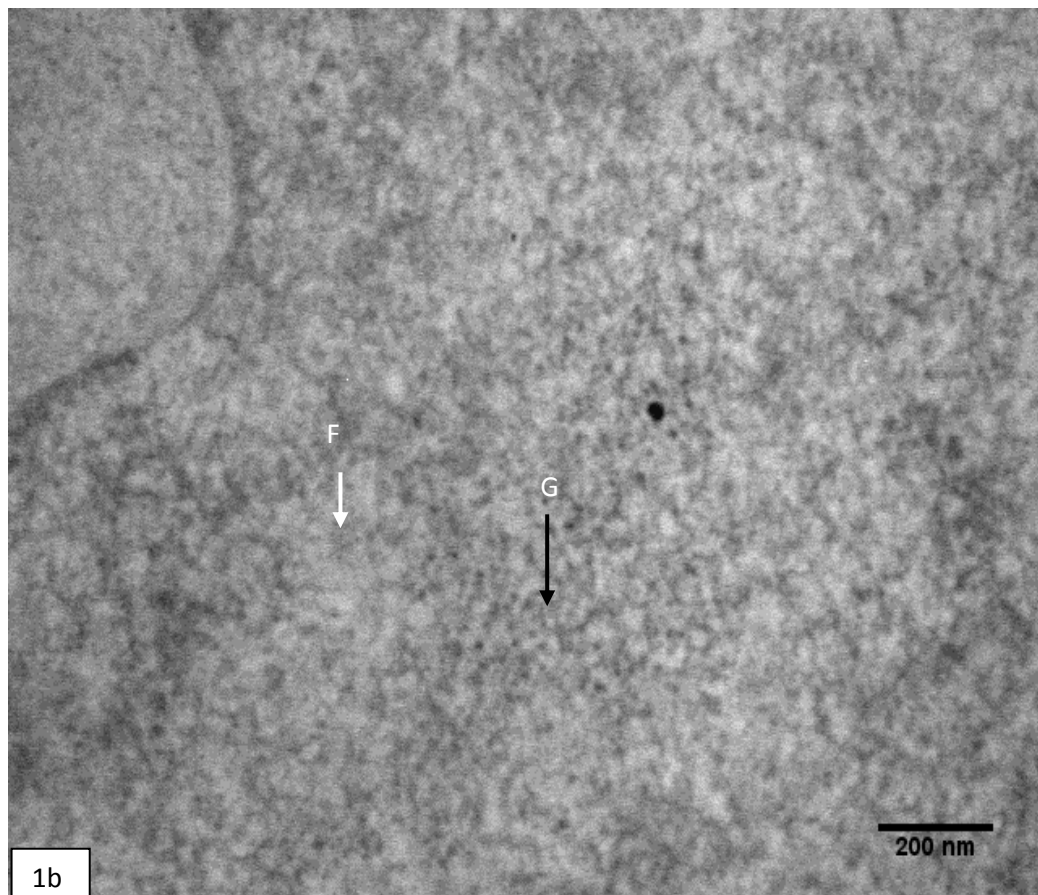


Figura 1b: Ultraestructura de células HEp-2, procesadas para MET convencional b) zona fibrilar (F, flecha blanca), zona granular (G, flecha negra) (50,000x).

Dentro del núcleo se distinguen cúmulos de cromatina periférica, parte de un nucléolo, así como el nucleoplasma con regiones fibrilares y granulares dispersas en el nucleoplasma, principalmente en regiones intercromatinianas (figura 1b).

La visualización de compartimentos de factores de *splicing* (CFS) mediante la técnica preferencial para partículas de RNP, figura 2a, permitió la observación de cúmulos de cromatina (Cr) despigmentada así como material nucleoplásmico en tono gris que permite resaltar estructuras que corresponden a gránulos intercromatinianos (GI, flecha negra), así como estructuras fibrilares correspondientes a fibras pericromatinianas (FP, flecha blanca), figura 2b.

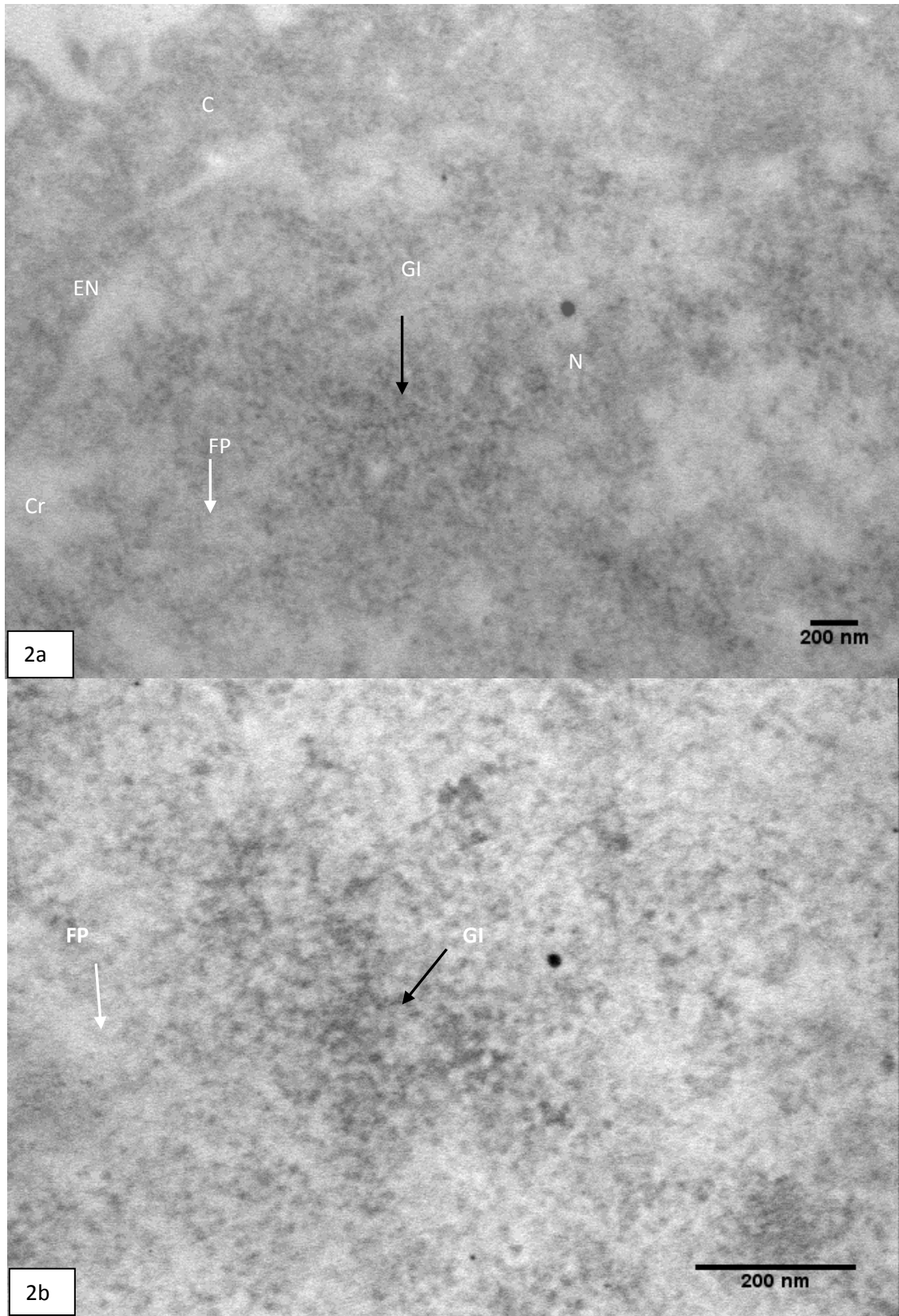


Figura 2: Ultraestructura de ribonucleoproteínas de células HEp-2, a) núcleo (N), citoplasma (C), cromatina (Cr), nucleoplasma (Np), envoltura nuclear (EN), gránulos intercromatinianos (GI; Flecha negra), fibras pericromatinianas (FP; flecha blanca). 25,000x. b) GI (flecha negra), FP (flecha blanca) 80,000x.



Se observaron las células procesadas para inmunomarcaje: unas sin tratamiento alguno para verificar la conservación ultraestructural de las células, otras procesadas para inmunomarcación con anticuerpo anti-SC35 como control positivo, un grupo más con amortiguador de fosfatos como control negativo y finalmente aquellas en las que el anticuerpo primario utilizado fueron las inmunoglobulinas G (IgG) purificadas provenientes de suero de pacientes. Las células marcadas con el anticuerpo anti-SC35 (figura 3 a y b) mostraron marca de oro coloidal en el nucleoplasma sobre todo en regiones de FP (flecha blanca); así como en cúmulos de GI (flecha negra). La marcación en nucléolo fue de escasa a nula coincidiendo con lo reportado<sup>15</sup>

El control negativo no presentó marcación inespecífica (figura 3 c)

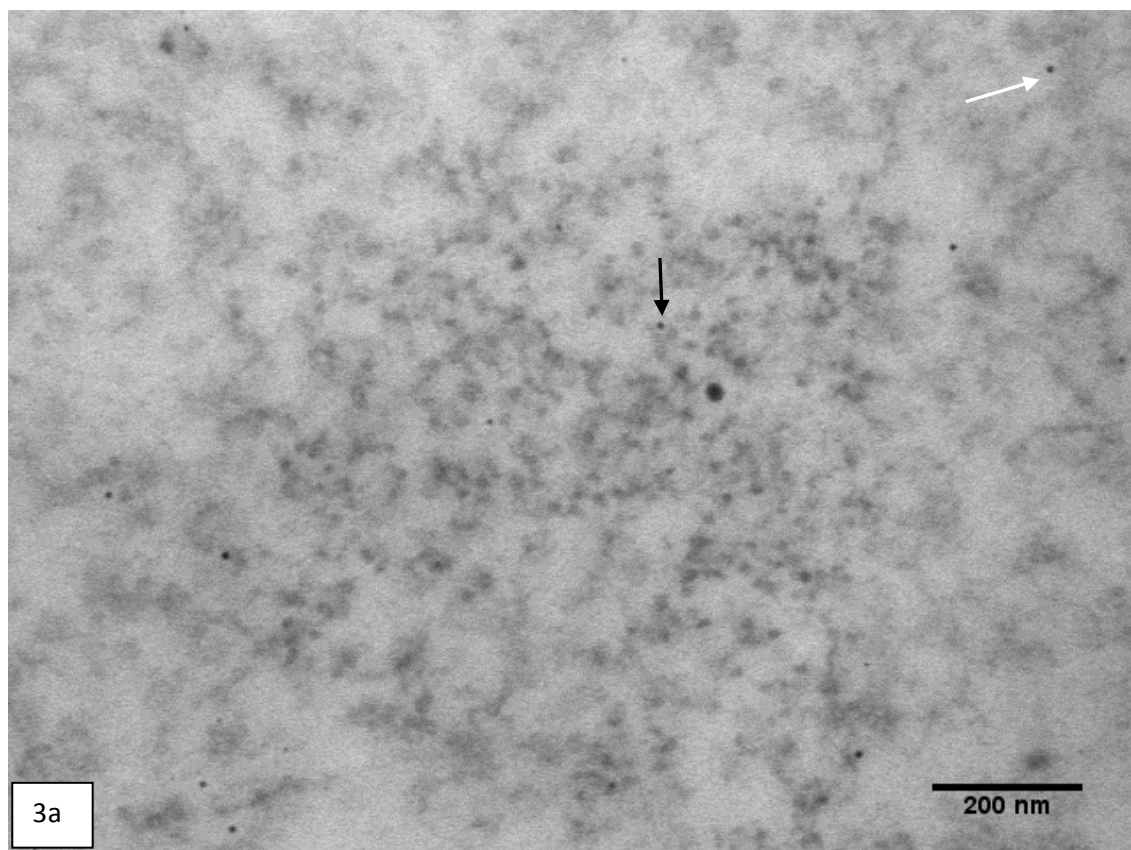


Figura 3. Inmunolocalización ultraestructural del factor SC35 en células HEp-2. a) El marcaje ocurre en la región fibrogranular, Flecha negra GI y Flecha blanca FP (60,000x)

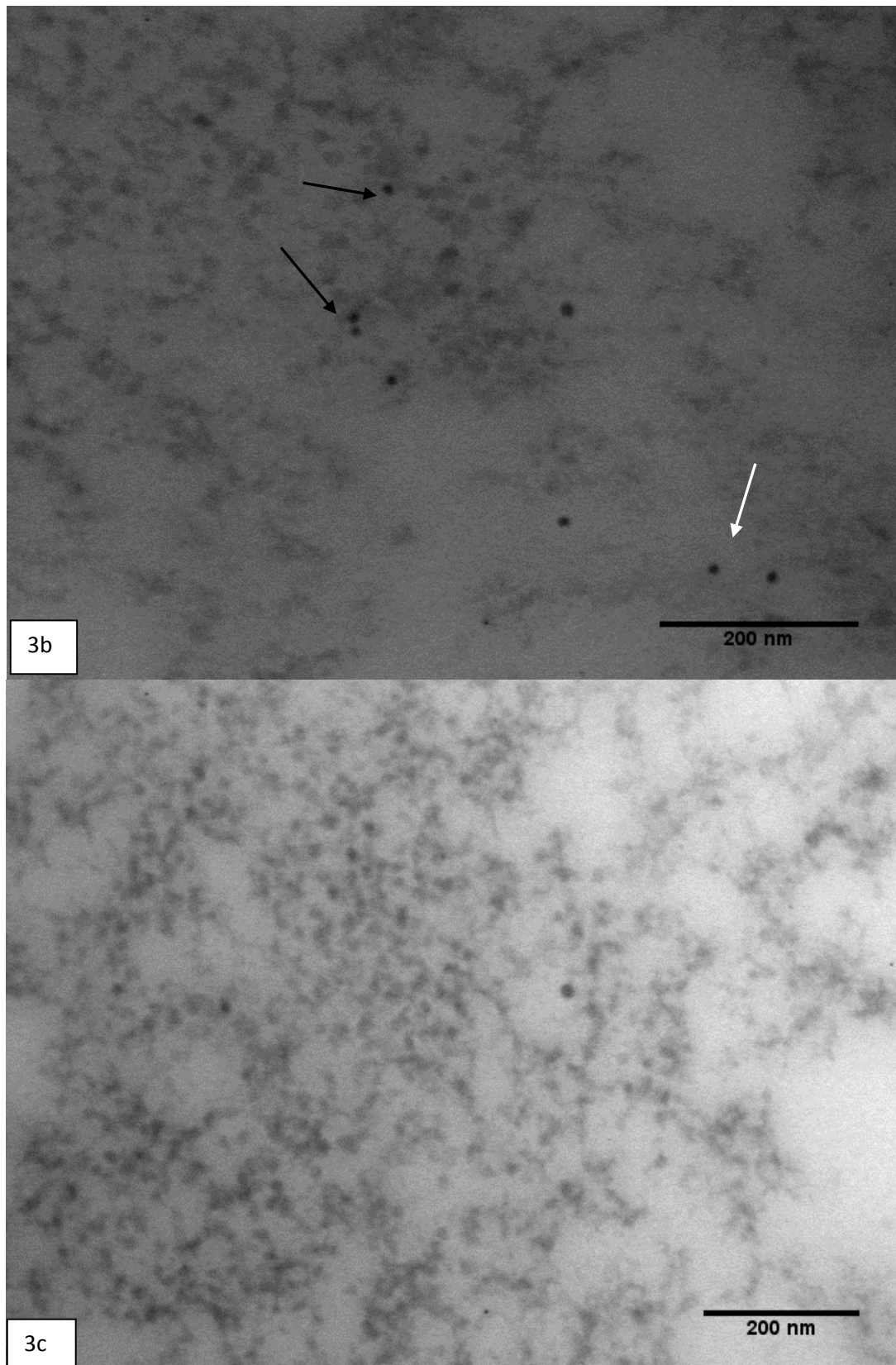


Figura 3: Inmunolocalización ultraestructural del factor SC35 en células HEp-2. b) Ampliación del nucleoplasma marca en GI (flecha negra) y FP (flecha blanca), 100,000x. c) Control: nucleoplasma contiene material fibrogranular conservado y sin marcación de oro coloidal, 80,000x.

La inmunolocalización con oro coloidal de IgG proveniente de pacientes se calificó con la revisión de 5 células que mostraran núcleo y nucléolo(s). La marcación fue evaluada mediante conteo de gránulos de oro por campo a 60,000 aumentos. Estos valores fueron tabulados para luego determinar si existía diferencia entre los grupos de MG y MF en cuanto a la presencia de marcación en las regiones de interés:

núcleolo, nucleoplasma (CGI, FP) y citoplasma (cuadro 13 y 14)

<b>Inmunomarcación por Zona (MET)</b>			
<b>Patrón/Zona</b>	<b>Núcleolo (n= 29)</b>	<b>Nucleoplasma (n= 33)</b>	<b>Citoplasma (n=16)</b>
<b>MF (n=19)</b>	15 (79%)	19 (100%)	6 (32%)
<b>MG (n=15)</b>	14 (74%)	14 (93%)	10 (66%)
<b>P</b>	NS	NS	NS

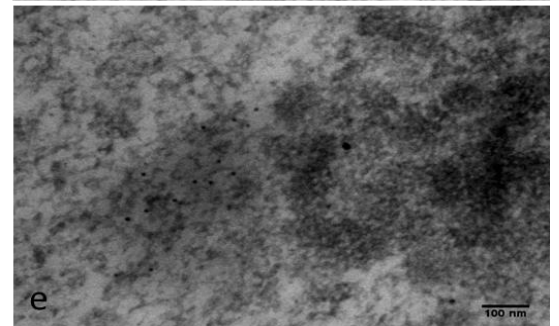
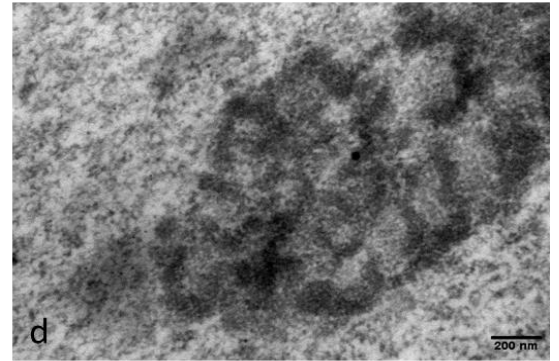
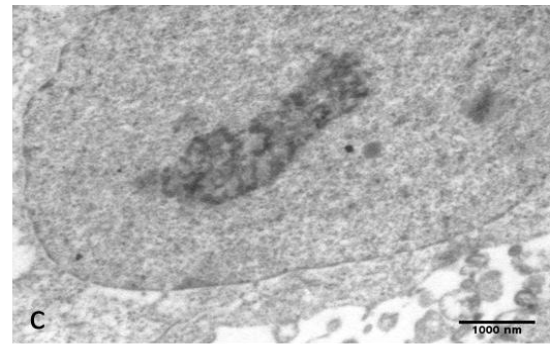
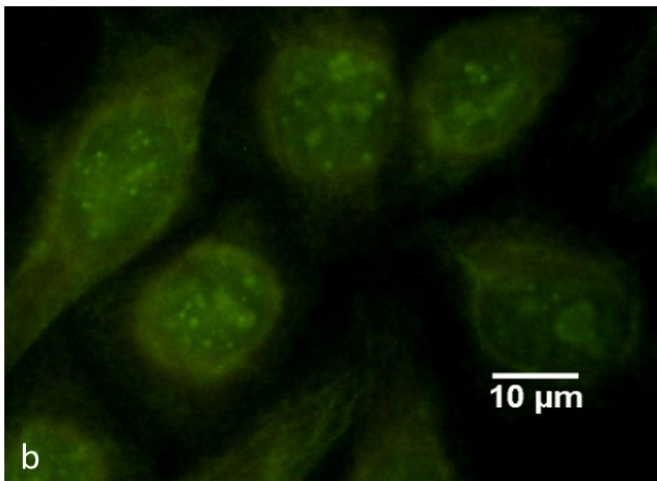
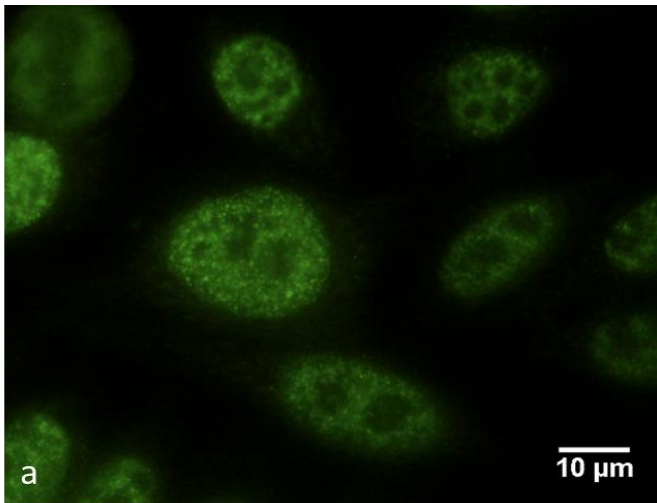
**Cuadro 13.** MET microscopía electrónica de transmisión, MF: moteado fino, MG: moteado grueso

El análisis estadístico de la inminelectromarcación (MET) en estructuras de interés, citoplasma, nucleoplasma y nucléolo, demostró que no existe evidencia estadística suficiente que indique diferencia entre los grupos calificados como MF y MG por IFI. Aplicando la prueba U de Mann-Whitney, obtenemos que no existe diferencia entre estas dos pruebas con una  $p=0.543$  para MF y  $p=0.519$  para MG

La comparación del reconocimiento de la estructura de interés entre los dos métodos, es decir el nucléolo, nos muestra que el reconocimiento de éste se da en 29 de las 34 muestras mediante MET y en 15 de las 34 muestras mediante IFI, con una diferencias significativa entre ambos métodos ( $p<0.05$ ).

La comparación, entre ambos métodos, se ve ilustrada en el cuadro 10, en el cuál se pueden observar los patrones MF y MG, por inmunofluorescencia, y la marcación por MET con anticuerpo proveniente de suero calificado como MF que muestra marcación con oro coloidal en nucleoplasma y nucléolo.

## Marcación nucléolos IFI versus MET



**Cuadro 14:** Comparación de patrón MF (a) y MG (b) de IFI versus marcación por MET (c, d y e) con anticuerpo extraído de suero de paciente con marcación original en IFI calificada como MF. a) Patrón MF, se pueden apreciar células HEp-2 con nucléolos negativos a la tinción, al igual que las células en metafase (100x). b) Patrón MG, se aprecian nucléolos positivos a la tinción y metafase negativa a la tinción (no mostrada) (100x). c) Marcación por MET de célula Hep-2, se aprecia núcleo con nucléolo y envoltura nuclear (12,000x). d) Acercamiento de nucléolo, se observan centros fibrilares y región fibrilar densa, se logra apreciar región con marcación en nucléolo y nucleoplasma (40,000x). e) Acercamiento de marcación con oro coloidal concentrada sobre nucléolo (80,000x)

En cuanto al análisis de las estructuras marcadas en función a la patología proveniente, podemos observar que 10 de los 29 casos (35%), de marcación positiva para nucléolo, corresponden a ESL, lo que equivale al 100% de los casos de ESL. LES representa el 21% de los casos de nucléolo positivo y 85% de los casos de LES presentan esta marcación. CBP y SS representan, cada uno, el 10% de nucléolos positivos. Los casos de HEPAUT y EMTC, aportan 7% individualmente, y el 10% restante es aportado en partes iguales por DRMTMOS, HTP y ESD.

La marcación de nucleoplasma (33), fue positiva para todos los casos de todas las patologías a no ser por un único caso de ESL que no presentó marcación (cuadro 15).

<b>Marcación Según Patologías Presentes</b>							
	<b>NUCLÉOLO (n=29)</b>	<b>p</b>	<b>NUCLEOPLASMA (n=33)</b>	<b>p</b>	<b>CITOPLASMA (n=16)</b>	<b>p</b>	
<b>ESL (n=10)</b>	10	0.3	9	0.3	6	0.46	
<b>LES (n=7)</b>	6	1	7	1	4	0.68	
<b>CBP (n=5)</b>	3	0.15	5	1	3	0.65	
<b>SS (n=3)</b>	3	1	3	1	1	1	
<b>HEPAUT (n=3)</b>	2	0.39	3	1	1	0.47	
<b>EMTC (n=2)</b>	2	1	2	1	0	0.49	
<b>DRMT MOS (n=2)</b>	1	0.28	2	1	0	0.49	
<b>HPT (n=1)</b>	1	1	1	1	0	1	
<b>ESD (n=1)</b>	1	1	1	1	1	0.47	

**Cuadro 15.** ESL: escleroderma limitada, LES: lupus eritematoso sistémico, CBP: cirrosis biliar primaria, SS: síndrome de Sjögren, HEPAUT: hepatitis autoinmune, EMTC: enfermedad mixta del tejido conjuntivo, DRMTMOS: dermatomiositis, HPT: hipotiroidismo, ESD: escleroderma difusa.

En el cuadro 16 se resumen los patrones generados por IFI versus las estructuras marcadas por MET de acuerdo a la patología proveniente. Según este criterio la IFI muestra diferencias entre patologías ( $p < 0.05$ ), al menos para ESL y LES; a diferencia de la marcación del nucléolo por MET ( $p = 0.58$ ), que no muestra diferencias según la patología de donde provenga el suero.

<b>Comparación de Marcación Según Patologías Presentes (IFI vs MET)</b>				
	IFI			INMUNO MARCACIÓN MET
	MF	MG	p	Nucléolo
<b>ESL (n=10)</b>	1 (10%)	9 (90%)	0.001	10 (100%)
<b>LES (n=7)</b>	7 (100%)	0	0.01	6 (86%)
<b>CBP (n=5)</b>	2 (40%)	3 (60%)	0.63	3 (60%)
<b>SS (n=3)</b>	3 (100%)	0	0.23	3 (100%)
<b>HEPAUT (n=3)</b>	1 (33%)	2 (67%)	0.57	2 (67%)
<b>EMTC (n=2)</b>	2 (100%)	0	0.43	2 (100%)
<b>DRMTMOS (n=2)</b>	2 (100%)	0	0.43	1 (50%)
<b>HPT (n=1)</b>	1 (100%)	0	1	1 (100%)
<b>ESD (n=1)</b>	0	1 (100%)	1	1 (100%)

**Cuadro 16.** ESL: escleroderma limitada, LES: lupus eritematoso sistémico, CBP: cirrosis biliar primaria, SS: síndrome de Sjögren, HEPAUT: hepatitis autoinmune, EMTC: enfermedad mixta del tejido conjuntivo, DRMTMOS: dermatomiositis, HPT: hipotiroidismo, ESD: escleroderma difusa.

El análisis de los anticuerpos presentes según la marcación por MET de citoplasma, nucleoplasma y nucléolo, se muestra en el cuadro 17, no observándose diferencias entre grupos.

<b>Anticuerpos Presentes según Marcación MET</b>			
	<b>Nuécleo (n=29)</b>	<b>Nucleoplasma (n=33)</b>	<b>Citoplasma (n=16)</b>
<b>CENT-B (n=8)</b>	7	7	4
<b>DNA (n=4)</b>	4	4	2
<b>NCLSMA (n=15)</b>	12	15	7
<b>RNP/Sm (n=7)</b>	7	7	3
<b>Scl-70 (n=2)</b>	2	2	0
<b>Sm (n=6)</b>	6	6	4
<b>SSA (n=22)</b>	15	22	9
<b>SSB (n=7)</b>	5	7	3

**Cuadro 17.** CENT-B: centrómero B, DNA: ácido desoxirribonucleico, RNP/Sm: ribonucleoproteínas/Smith, SSA: síndrome de Sjögren A, SSB: síndrome de Sjögren B.

La presencia de anticuerpos contra DNA y nucleosomas, reportados como característicos de la expresión del patrón de IFI denominado homogéneo, nos conduce a verificar que es lo que sucede si reclasificamos las muestras que presentan dichos anticuerpos como homogéneos y los comparamos con aquellos clasificados como moteados -que no presentan especificidad para dichos anticuerpos- por inmunomarcación mediante MET del nucléolo, nucleoplasma y citoplasma (cuadro 18).

<b>Inmunomarcación MET Homogéneo/Moteado</b>			
	<b>Núcleolo (n=29)</b>	<b>Nucleoplasma (n=33)</b>	<b>Citoplasma (n=16)</b>
<b>Homogéneo (n=17)</b>	14 (82.4%)	17 (100%)	8 (47.1%)
<b>Moteado (n=17)</b>	15 (88.2%)	16 (94.1%)	8 (47.1%)

**Cuadro 18**

En la comparación de la marcación se puede apreciar que 82.4% de las muestras que fueron reclasificadas como homogéneo produjeron marcación en nucléolo así como el 88.2% de aquellas clasificadas como moteado. La marcación de nucleoplasma se dio en 100% del grupo clasificado como homogéneo y 94.1% del grupo moteado. En el citoplasma se encontró marcación similar tanto en el grupo de patrón homogéneo como moteado.



## 11. Discusión y Conclusiones

La frecuencia del patrón- en la población en estudio -denominado como moteado coincide con los estudios previamente publicados<sup>32, 33, 34, 35, 36</sup>. La frecuencia de los patrones MG y MF a diluciones menores a 1:640 es mayor para MG (36%) que para MF (26%) del total de la muestra obtenida durante el período de recolección. Una vez seleccionadas las muestras con diluciones iguales o mayores a 1:640 la frecuencia de MG representa el 44% de la muestra final (34) y MF 56%.

La determinación de especificidad de anticuerpos mediante ELISA no mostró diferencias significativas entre patrones MG y MF para anticuerpos contra DNACd, nucleosoma, Scl-70, SSA, SSB; presentándose la diferencia únicamente en el caso de anticuerpos contra RNP/Sm y Sm, presentes en las muestras con expresión de patrón MF. Además se observó diferencia significativa en la presencia de anticuerpos anti Centrómero-B, presente mayormente en muestras calificadas como MG, esto último puede atribuirse a que más del 30% de la muestra proviene de pacientes con diagnóstico de ESL, patología en la cual se ha reportado como discriminante la presencia de anticuerpos anticentrómero<sup>5,6</sup>.

La MET, permitió el reconocimiento de material fibrogranular, por los anticuerpos de pacientes, dicho material corresponde a los llamados gránulos intercromatinianos y fibras pericromatinianas, por su distribución, tamaño, forma y tinción preferencial. Así como por su colocalización con la marcación producida por el anticuerpo control anti-SC35<sup>37</sup>.

El análisis de los anticuerpos purificados de pacientes, mediante inmunoelectromarcación, no mostró diferencias significativas entre grupos en la marcación de citoplasma, nucleoplasma y nucléolo. La marcación, mostro una distribución similar -sobre todo- en el caso de nucleoplasma y del nucléolo lo que puede explicarse, precisamente, por la presencia ya descrita de anticuerpos anti RNP/Sm y Sm. El antígeno Sm se ha reportado como una estructura íntimamente ligada a los factores de splicing participando en el proceso de reimportación de diversos UsnRNPs del citoplasma al núcleo<sup>36</sup>. De igual forma se ha sugerido la participación de Sm y de un complejo proteico similar a Sm, en la unión de U4 y U2,

respectivamente, para el transporte y anclaje de snRNP al nucléolo<sup>38</sup>. Se tienen también reportes de la presencia de elementos de localización nucleolar en los cuerpos de Cajal, además del nucléolo, que permitirían anclar snRNP (U4snRNA) para el proceso de ensamble en la formación de di-snRNP [U2/U4]<sup>39</sup>. Con lo que se sustenta la idea de que algunos pasos del ensamble de proteínas snRNP suceden en el nucléolo y otras estructuras nucleares<sup>39</sup> en un proceso dinámico, en torno al referido proceso de la compartimentalización de los factores de *splicing* en los CGI y FP<sup>12, 22, 24</sup>. Por lo que la presencia de anticuerpos anti RNP/Sm y anti-Sm y su participación en el procesamiento de snRNAs y de tri-snRNP (U4/U6.U5) con tráfico dinámico entre citoplasma, nucleoplasma y nucléolo<sup>17, 39</sup> explican la presencia de inmunoelectromarcación de nucléolos al emplear IgG's provenientes de sueros clasificados como MF que por IFI no mostraban tinción en el nucléolo.

El análisis de la distribución de patologías según las dos técnicas, nos muestra que aquellas que se presentaban claramente diferentes en la expresión de patrones MG y MF, es decir, ESL y LES, al analizar la marcación de estructuras por MET no presentan ninguna diferencia y marcan por igual al nucléolo. Esto nos indica, que los patrones MG y MF, son indistinguibles por un método de mayor resolución y podrían formar un único patrón, lo que estaría respaldado por estudios<sup>4, 5, 8</sup> y consensos realizados<sup>9, 41</sup>, en los que si bien hay asociación de éstas patologías con un patrón moteado, ninguna hace la diferenciación según la tinción positiva del nucléolo. Ya dentro nuestro estudio, esta aseveración se ve reforzada por la situación similar que presenta el análisis de la distribución de marcas según la especificidad de anticuerpos, no observándose diferencias significativas en la marcación de nucléolo y nucleoplasma, que como se explicó anteriormente podría deberse al dinamismo de las moléculas involucradas en el *splicing*.

En la frecuencia de AAN presentes también se observaron 4 casos con anticuerpos antiDNA y 15 casos con anticuerpos antinucleosomas, estructuras altamente relacionadas entre sí y que siguiendo algunos algoritmos propuestos para la calificación de patrones por IFI<sup>10, 41</sup>, podrían haber correspondido a un patrón homogéneo. Si se considera realizar la reclasificación, 17 casos quedan incluidos dentro la denominación de "patrón homogéneo"; pese a la tinción negativa de células en división. Los dos nuevos grupos formados: homogéneo y moteado muestran una distribución similar de la marcación en nucléolo, nucleoplasma y citoplasma, situación

que se había observado previamente al analizar la distribución de la marcación tomando en cuenta únicamente la especificidad de anticuerpos versus inmunomarcación mediante MET.

La presencia del patrón homogéneo, así como de anticuerpos antiDNA y nucleosoma son considerados por algunos autores como característicos de LES<sup>42</sup> y su presencia ha sido asociada a la afectación de distintos órganos y puede ser considerada incluso como un valor predictivo de la enfermedad; aunque no son exclusivos de ésta patología y se ha generado también duda en cuanto a los títulos a considerarse positivos para LES<sup>43</sup>.

Este hallazgo, junto con los anteriormente descritos, nos conduce a concluir que:

- La clasificación del patrón moteado en MG y MF, resulta innecesaria, pues son parte de un solo patrón que marca el nucléolo con diferente intensidad, incluso imperceptible para la resolución del microscopio de fluorescencia.
- Las pruebas de especificidad, para RNP/Sm y SM, no son discriminantes para realizar la división del patrón moteado en MG y MF.
- La IFI, como técnica para el tamizaje de EA debe ser interpretada con prudencia, dándole el valor que su especificidad y sensibilidad permiten.
- En el caso del patrón de IFI moteado, la determinación de especificidad de anticuerpos mediante ELISA, no debe restringirse únicamente a aquellos anticuerpos relacionados a RNP; sino que deberán ampliarse para descartar la presencia de anticuerpos relacionados a la cromatina, para evitar el obviar o pasar por alto ciertas patologías concomitantes o afectación de órganos en el diagnóstico.

## 12. Perspectivas y Recomendaciones

Se recomienda fortalecer estos resultados mediante:

- Ampliación del tamaño de muestra con igual número de casos por patología.
- Emplear métodos de purificación de anticuerpos de mayor resolución y rendimiento.
- El empleo de AAN purificados asociado al uso de MET puede ser un recurso útil para la revisión de las definiciones de los diversos patrones expresados en células HEp-2, para dotar al método de mayor objetividad
- Aplicación de microscopia de alta resolución que permita distinguir objetivamente los patrones de IFI, a un costo menor que la MET.
- Seguir recomendaciones y algoritmos sugeridos por estudios multicéntricos, que consideren las limitaciones de las técnicas y que orienten al médico en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las EA.

## **12. Anexos**

### **1. Tamizado inicial mediante IFI con células HEp-2, como sustrato**

El procedimiento, se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (The Binding Site) y certificación ISO 9001-2008. Brevemente este consta de incubación inicial de células HEp-2 -fijadas con alcohol – en cámara húmeda, temperatura ambiente durante 20 minutos con 20 µl de suero de pacientes (dilución 1:40), calibradores (diluciones: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560 y 1:5120) y controles (positivo y negativo). Seguida de una serie triple de lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) durante 5 minutos con agitación constante. Posteriormente incubar durante 20 minutos con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), finalizando con una serie de lavados con la solución amortiguadora y montaje de laminillas. La lectura de laminillas fue realizada por tres observadores experimentados, siguiendo las recomendaciones del International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (IWAA) y con un coeficiente de correlación interobservador mayor a 0,8. Las lecturas fueron realizadas en un microscopio de epifluorescencia con magnitud de 40x (Axioscop, Carl Zeiss, lámpara HBO de 100 watts; Titulador virtual: Image Titer, Inc). Los valores de referencia para la lectura de laminillas fueron determinados con anterioridad en donadores de sangre de la institución<sup>40</sup>.

### **2. Determinación de la presencia de AAN mediante inmunoensayo de absorción ligado a enzimas (ELISA)**

La determinación de especificidad de anticuerpos se realizó en equipo automatizado DSX de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (DYNEX Technologies, The Binding Site y Orgentec).

De manera general el proceso consiste en realizar la dilución y homogeneizado de muestras en placas de pozo profundo, para luego adicionar 100 µl a placas sensibilizadas con el antígeno; así como de calibradores y controles, las cuales se someten a incubación a temperatura ambiente (21-23 °C) seguida de lavado triplicado. Al terminar se adiciona e incuba con conjugado anti-IgG humana marcada con peroxidasa, a temperatura ambiente, seguida de un nuevo ciclo de lavados. A continuación se agrega 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina e incuba a

temperatura ambiente, para luego añadir la solución de paro con la que nuevamente se incubaba a temperatura ambiente. La placa se agita una vez más por 3 segundos y se lee a 450nm de longitud de onda.

No se cuentan con valores de referencia propios para anticuerpos contra ribonucleoproteínas y/o moléculas relacionadas; por lo que estos son tomados de los sugeridos por las casas comerciales.

### **3. Purificación de anticuerpos de isotipo IgG**

La purificación de inmunoglobulinas de isotipo IgG se realizó mediante cromatografía de afinidad, mediante el empleo de columna comercial: Prosep G-Millipore, empleada según especificaciones del fabricante.

Que descrita brevemente consiste en equilibrar columna agregando 5 ml de reactivo A (1.5 M Glycine/NaOH buffer, 3 M NaCl, pH 9.0) mediante centrifugación a 18000 rpm por 5 min. Las muestras previamente diluidas (1:1) con el amortiguador A fueron transferidas a la columna y centrifugadas a 1000 rpm durante 20 min. Se adicionaron 5 ml de A y centrifugadas a 18000 rpm por 5 min. Las muestras son eluidas con 5 ml de reactivo B (0.2 M Glycine/HCl buffer pH 2.5), recuperando el eluido sobre 0.65 ml de reactivo C (1 M Tris/HCl buffer pH 9.0) para su neutralización.

La estimación de concentración de inmunoglobulinas fue realizada mediante el método de ácido bicinconínico (BCA) para la cuantificación de proteínas.

La concentración de extractos de IgG, se realizó con el empleo de columnas Amicon Ultra 30K, para lo cual el volumen del extracto fue vertido en dichas columnas y centrifugadas en forma seriada a 3500rpm por 5 minutos hasta obtener volumen final de aproximadamente 0.8ml.

### **4. Inmunomarcaje de células HEp-2 mediante inmunomarcaje por MET.**

**4.1. Cultivo celular de línea celular:** HEp-2, derivada de carcinoma epidermoide de laringe humano, catalogada por la ATCC como: CCL-23; siguiendo sus recomendaciones para su conservación y cultivo.

## **4.2. Procesamiento de células HEp-2 para microscopia electrónica:**

Las células cultivadas fueron procesadas para:

**4.2.1 Morfología;** para la verificación de integridad así como para el reconocimiento ultraestructural de las células sustrato (HEp-2). Las células HEp-2 cultivadas durante tres días fueron lavadas por triplicado con PBS y fijadas con glutaraldehído (2,5%, en amortiguador de cacodilatos) durante 1 hora para luego enjuagarlas por triplicado con amortiguador de cacodilatos durante 5 minutos. La posfijación fue realizada con tetra óxido de osmio durante 1 hora, seguida de una serie gradual de deshidratación (etanol: 50, 70, 90, 96 y 100%). Las células fueron despegadas con espátula (Corning INC.) y transferidas a tubos para centrifugarlas a 2500 rpm para la formación de botón. El botón fue sometido a óxido de propileno como intermediario de pre inclusión, inicialmente puro y luego en cambios graduales de mezclas con resina Epón 800 (2:1,1:1,1:2). Finalmente se realizaron dos cambios de resina pura, para poner el último cambio a inclusión durante toda la noche a 60°C. Se realizaron cortes entre 70 y 90 nm, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en microscopio Jeol JEM-1010 con cámara digital CCD-300-RC, MT-1 acoplada al microscopio con el programa Scion Image.

**4.2.2 Electroinmunolocalización,** para la localización de antígenos celulares, se procesaron cultivos de HEp-2 a 4°C, iniciando con el retiro del medio de cultivo con PBS, para posteriormente fijar con mezcla de paraformaldehído 4% por 17 horas y enjuagaron por triplicado con PBS y deshidratar con serie de alcoholes (50, 70, 90, 96 y 100%).

La preinclusión se realiza con mezclas crecientes de etanol absoluto y resina LR-White (2:1,1:1,1:2) y dos cambios de resina pura. La inclusión se realizó en resina pura a 60°C en moldes herméticos. Los cortes (60-90 nm) se recogieron en rejillas de níquel cubiertas con collodion.

Para el proceso de inmunomarcaje se permeabilizaron los cortes con solución TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Retirado el exceso de humedad se puso en contacto con anticuerpo comercial y extractos de sueros problema en cámara húmeda a 4°C por 17 horas. Se lavó en amortiguador durante 5 minutos por triplicado para luego incubar con el anticuerpo secundario

(dilución 1:20) por 1 hora, seguida de lavado con TBS-Tween y agua. Las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para realizar las observaciones en microscopio Jeol JEM-1010 con cámara digital CCD-300-RC, MT-1 acoplada al microscopio con el programa Scion Image.



### 13. Bibliografía.-

1. Smith. M., Lahita R.; Tratado de enfermedades autoinmunitarias; McGraw-Hill Interamericana; 1ªed ; 2002.
2. Connie R.M., Diene T., Autoimmune Diseases; Prentice Hall, 2006.
3. Longo D. L., Kasper D. L., Jameson J. L., Fauci A.S., Hauser S. L., Loscalzo J.; Harrison Principios de Medicina Interna, 18a ed.; 2012
4. Mengeloglu Z., Tas T., Kocoglu E., Aktas G., Karabök S. ;Determination of anti-nuclear antibody pattern distribution and clinical relationship ; Pak J Med Sci 30(2) :380-383 ; 2014.
5. Kavanaugh A., Russell Tomar, Reveille J., Solomon D.H, Homburger H. A; Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens; Arch Pathol Lab Med; Vol. 124, No. 1, pp. 71–81; 2000.
6. Rodriguez-Reyna T., Hinojosa-Azaola A, Martinez-Reyes C., Nuñez-Alvarez C.A., Torrico-Lavayen R., García-Hernández J.L., Cabiedes-Contreras J.; Distinctive autoantibody profile in Mexican Mestizo Systemic Sclerosis Patients.; Autoimmunity; 2011.
7. Yashwant K., Alka B., and Ranjana W. M.; Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: A journey revisited, Diagnostic pathology, 2009.
8. Bradwell A, Stokes R, Meed G.; Advanced atlas of autoantibody patterns. Birmingham, England: The Binding Site Ltd; 1999.
9. Image library: <http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity>.
10. Cabiedes. J.; Núñez-Alvarez C.A.; Anticuerpos Antinucleares. Reumatología Clínica; 2009.
11. Kumar Y., Alka B., Ranjana W.M.; Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited; Diagnostic Pathology; doi: 10.1186/1746-1596-4-1, 2009.

12. Buchner, C., Bryant, C., Eslami, A., Lakos, G. Anti-Nuclear Antibody Screening Using HEP-2 Cells. *J. Vis. Exp.* (88), e51211, doi: 10.3791/51211; 2014.
13. Burger C.B., Tuschl T., Sharp P.A. ; *Splicing* of precursor to m-RNAs by the spliceosoma; The RNA World; 2° ed.; Cold Spring Harbor Lab. Press; 1999
14. Wang, Y., Xiao, X., Zhang, J., Choudhury, R., Robertson, A., Li, K., Ma, M., Burge, C.B., and Wang, Z.; A complex network of factors with overlapping affinities represses splicing through intronic elements; *NSMB* 20, 36-45, 2013; (Epub 2012 Dec 16), 2012.
15. Reed R., Hurt E.; A Conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing; *Cell*, Volume 108, Issue 4, 523-531, 22; 2002.
16. Misteli T.; Cell Biology of transcription and pre-mRNA *splicing*: nuclear architecture meets nuclear function; *J. Cell Sci* 113, 1841-1849; 2000.
17. Misteli T., Caceres F.J., Spector D.L.; The dynamics of pre-mRNA *splicing* factor in living cells; *Nature* 387, 523-527; 1997.
18. Spector D. L., Fu XD and Maniatis T.; Associations between distinct pre-mRNA *splicing* components and the cell nucleus; *The EMBO Journal* vol.10 no.11;3467-3481; 1991.
19. Fu XD; Specific commitment of different pre-mRNAs to *splicing* by single SR proteins; *Nature* 365, 82 – 85; 1993.
20. Lin S., Coutinho-Mansfield G., Wang D., Pandit S. and Fu XD; The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation; *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 819 – 826; 2008.
21. Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D., Bubulya, P., Neuwald, A.F., and Spector, D.L. Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol Biol Cell* 15, 3876-3809, 2004.
22. Moneron A., Bernhard W.; Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells; *Journal of Ultrastructure Research*, 27: 266-288.; 1969.
23. Jiménez-García L.F., Lara-Martínez R., Gil I., Zamora A., Salcedo M., Agredano-Moreno L., Moncayo J.J., Segura L.; *BIOLOGÍA CELULAR DEL SPLICING*; Mensaje Bioquímico Vol. XXXI; Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.

24. Spector D.L., O`Keefe R.T., Jimenez-Garcia L.F.; Dynamics of transcription and pre-mRNA *splicing* within the mammalian cell nucleus; Cold Spring Harbor Symp; Quant. Biol. 58, 799-805; 1993.
25. Misteli T., Spector D.L.; RNA polimerase II targets pre-mRNA *splicing* factor to transcription sites in vivo; Mol. Cell 3, 679-705; 1999.
26. Melcak I., Melcakova S., Kopsky V, Vecerova J. and Raska I.; Prespliceosomal Assembly on Microinjected Precursor mRNA Takes Place in Nuclear Speckles; Molecular Biology of the Cell; Vol. 12, 393–406, 2001.
27. Battle DJ., Kasim M., Yong J., Lotti F., Lau CK., Mouaikel J., Zhang Z., Han K., Wan L., Dreyfuss G.; The SMN complex: an assembly machine for RNPs; Cold Spring Harb Symp Quant Biol.; 71:313-20; 2006.
28. Jiménez-García L.F. and Spector D.L.; In vivo evidence that transcription and *splicing* are coordinated by a recruiting mechanism. Cell 73, 47-59; 1993.
29. George-Tellez R., Segura-Valdez ML, Gonzales-Santos L., Jiménez-García LF.; Cellular Organization of pre-mRNA *Splicing* Factors in Several Tissues. Changes in the Uterus by Hormone Action; Biology of the Cell; 2002.
30. Faustino, N. A. and Cooper T. A.; Pre-mRNA splicing and human disease; Genes & Development 17:419–437; 2003.
31. Wang J., Zhang J., Li K., Zhao W., Cui Q.; Splice Disease database: linking RNA *splicing* and disease; Nucleic acids research, 40:D1055–D1059, 2011.
32. Wananukul S., Voramethkul W., Kaewopas Y., Hanvivatvong O.; Prevalence of positive antinuclear antibodies in healthy children; Asia Pac J Allergy Immunol; Jul-Sep; 23 (2-3) :153-7; 2005.
33. Hoffman Ilse E.A., Peene I., Veys E. M., De Keyser F.; Detection of Specific Antinuclear Reactivities in Patients with Negative Anti-nuclear Antibody Immunofluorescence Screening Tests; Clinical Chemistry 48:12,2171–2176; 2002.
34. Carpinelli M.M., Giménez V., Ferreira L., Rovira C., Picaguá E., Granados E.; Frequency of antinuclear antibody patterns in patients with SLE clinical; Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 8 (2), pp 27-33; 2010.

35. Marin G.G., Cardiel M.H., Cornejo H., Viveros M. E; Prevalence of Antinuclear Antibodies in 3 Groups of Healthy Individuals Blood Donors, Hospital Personnel, and Relatives of Patients With Autoimmune Diseases; *Journal of Clinical Rheumatology*; Vol. 15, Number 7, pp. 325–329; 2009.
36. Burnham T.K., Kleinsmith D.M., The "true speckled" antinuclear antibody (ANA) pattern: its tumultuous history; *Semin Arthritis Rheum*; Nov 13(2):155-9; 1983.
37. Spector D. L., Lamond A.I.; Nuclear Speckles; *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a000646; 2011
38. Fischer U., Darzynkiewicz E., Tahara S.M., Dathan N.A, Lührmann R., and Mattaj I.W.; Diversity in the signals required for nuclear accumulation of U snRNPs and variety in the pathways of nuclear transport. *J. Cell Biol.* 113:705–714; 1991.
39. Gerbi, S. A. and Lange, T. S., All small nuclear RNAs (snRNAs) of the [U4/U6.U5] trisnRNP localize to nucleoli: identification of the nucleolar localization element of U6 snRNA, *Mol Biol. Cell* 13, 3123-3137; 2002.
40. Rosas I., Gomez E.I, Núñez-Álvarez C.A, Huerta M.T, Alvarado A., Cabiedes J.; Referencia de puntos de corte. Prevalencia de anticuerpos anti-nucleares (ANN) en donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. *Revista Mexicana de Reumatología*; 2005.
41. Francescantonio, P.L.C. *et al.*; III Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Celulas HEp-2: perspectiva historica, controle de qualidade e associacoes clinicas; *J Bras Patol Med Lab*, v.45: n.3: 185-199; 2009.
42. Dellavance A.,Cruvinel W. de M., Francescantonio P.L.C., Manguiera P.C.L., Drugowick I.C., Rodrigues S.H., Andrade C. L.E.; Variability in the recognition of distinctive immunofluorescence patterns in different brands of HEp-2 cell slides; *J Bras Patol Med Lab*, v.49: n.3: 182-190; 2013.
43. Sjowall C., Sturm M., Dahle C.; Abnormal antinuclear antibody titers are less common than generally assumed in established cases of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 35: 1994-2000; 2008.