

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE UN PERFIL DE  
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN PACIENTES CON  
ENFERMEDADES REUMÁTICAS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**SANDRA GUADALUPE GONZÁLEZ MALAGÓN**

DIRIGIDA POR

**M. en C. CARLOS M. ARROYAVE HERNÁNDEZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2001

FACULTAD DE  
QUÍMICA



BIBLOTECA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**



**“IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE UN PERFIL DE  
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN PACIENTES CON  
ENFERMEDADES REUMÁTICAS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA  
**SANDRA GUADALUPE GONZÁLEZ MALAGÓN**

DIRIGIDA POR  
**M. en C. CARLOS M. ARROYAVE HERNÁNDEZ**

**SINODALES:**

CARLOS M. ARROYAVE HERNÁNDEZ

DIRECTOR

LETICIA DE LA ISLA HERRERA

PROPIETARIO

MA. ELENA VILLAGRÁN HERRERA

PROPIETARIO

JUANA SUSANA FLORES ROBLES

SUPLENTE

## AGRADECIMIENTOS

- A:
- Dios ... Por la conciencia que nos da para darnos cuenta de la maravilla que es la vida, el ser humano y todo lo que le rodea.*
- mis padres... por el gran amor y apoyo incondicional que me han dado desde antes de existir, por los hermanos que me regalaron y por impulsarme siempre a superarme.*
- mis hermanos... por ser las personas que han estado y estarán a mi lado y por compartir conmigo tantas vivencias, sonrisas, enojos, pero sobre todo por la paciencia que me han tenido desde que nos conocimos.*
- mis amigos y maestros ... por enriquecer tanto el camino que voy trazando en mi vida.*
- y a ti... que estuviste en mi mente y corazón en cada momento para seguir adelante.*

## DEDICATORIA

- *A los que aún no conozco pero que veo con los ojos de mi corazón y son la razón de todo lo que hago.*
- *A cada una de las personas que se verán beneficiadas con mi trabajo.*



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 <i>Especificidades de anticuerpos antinucleares</i>	4
III. OBJETIVOS	17
IV. METODOLOGÍA	18
IV.1 <i>Técnica de inmunoperoxidasa para anticuerpos antinucleares</i>	18
IV.2 <i>Ensayo inmunoenzimático</i>	19
V. RESULTADOS	23
VI. DISCUSIÓN	28
VII. CONCLUSIÓN	33
VIII. APÉNDICES	
VIII.1 <i>Determinación de anticuerpos antinucleares por inmunoperoxidasa indirecta.</i>	34

<b>VIII.2</b>	<i>Determinación de especificidad de los anticuerpos antinucleares.</i>	<b>36</b>
<b>IX.</b>	<b>GLOSARIO</b>	<b>37</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>38</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Causas de posibles resultados positivos para anticuerpos antinucleares	2
2. AAN comunes en enfermedades reumáticas sistémicas	6
3. Reactividad antigénica de AAN	21
4. Reactividad antigénica de AAN	22
5. Patrones encontrados en los sueros positivos con la prueba de inmunoperoxidasa	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Patrón mixto	25
2. Patrón granular o moteado	25
3. Patrón nucleolar	26
4. Patrón homogéneo	27
5. Patrón centrómero	27

## RESUMEN

La reumatología y la inmunología clínica se apoyan en las pruebas de laboratorio para el diagnóstico diferencial y el seguimiento de alteraciones de las enfermedades autoinmunes.

Junto con la identificación de nuevas especificidades de anticuerpos antinucleares (AAN), el creciente conocimiento de las asociaciones clínicas ha aumentado constantemente la demanda de tales pruebas. Por lo tanto, es muy importante que el médico además de pedir y conocer el significado de una prueba para AAN, solicite un perfil de las especificidades de estos anticuerpos, una vez que la prueba de rastreo de AAN, haya sido positiva.

En este trabajo se investigó la utilidad de la determinación del perfil de AAN en un suero positivo para éstos y en quien se sospechaba tenían lupus eritematoso sistémico (LES).

De 25 sueros reportados como positivos con la prueba de inmunofluorescencia, en 13 se corroboró su positividad con la técnica de inmunoperoxidasa, encontrando que cada uno de ellos, tenía varios anticuerpos que confirmaron LES o en su defecto, hicieron la sospecha de otra entidad clínica tal como esclerodermia o enfermedad de Sjögren.

La investigación confirma la importancia de tener la identificación de la especificidad de los AAN para que de esta manera se pueda hacer un diagnóstico clínico más específico, ya que como fue en el caso de este estudio, había otros diagnósticos clínicos diferentes al de LES.



## I. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos antinucleares (AAN) son un grupo de inmunoglobulinas que están dirigidos contra una variedad de componentes nucleares. En el ser humano así como en algunos animales, se han encontrado éstos como autoanticuerpos, los que en última instancia se asocian con enfermedades sistémicas reumáticas o autoinmunes. Las enfermedades con autoanticuerpos pueden dividirse en dos grandes grupos: *a) enfermedades autoinmunes órgano-específicas*, en las cuales los autoanticuerpos reaccionan con los antígenos presentes en un órgano o tejido específicos para éstos; como es en la enfermedad de Graves (anticuerpos contra antígenos tiroideos), diabetes mellitus dependiente de insulina (anticuerpos contra múltiples componentes de las células beta de los islotes de Langerhans), enfermedad de Addison (anticuerpos contra células suprarrenales), entre otras, y *b) enfermedades autoinmunes multisistémicas*, en las cuales los autoanticuerpos reaccionan con componentes celulares comunes presentes en todos los tejidos, teniendo como ejemplo al lupus eritematoso sistémico (LES)

La presencia de AAN es frecuente en enfermedades que se agrupan como reumáticas sistémicas tales como LES, esclerodermia o esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren (SS) (con o sin artritis reumatoide), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), polimiositis, y su variante, dermatomiositis.

En la evaluación inicial de estos pacientes, se solicita la identificación de AAN, la cual, desde hace años, se hace utilizando células de un carcinoma laríngeo epitelial de humano, denominadas HEp-2.

Aunque los AAN se encuentran en la mayoría de las enfermedades reumáticas, existe una larga lista de condiciones no reumáticas asociadas con éstos, incluyendo a personas aparentemente sanas (cuadro 1).

## Cuadro 1

### Causas de posibles resultados positivos para AAN

<b>1. Enfermedades reumáticas</b>	<u>Porcentaje positivo</u>	<u>Acs. específicos de la enfermedad</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Enfermedad</u></li> <li>• LES</li> <li>• Esclerosis Sistémica</li> <li>• Síndrome de Sjögren</li> <li>• EMTc</li> <li>• Polmiositis/ Dermatomiositis</li> <li>• Artritis Reumatoide.</li> </ul>	<p>&gt;95%</p> <p>60%-90%</p> <p>75%</p> <p>95%-99%</p> <p>25%</p> <p>15%-35%</p>	<p>anti-Sm, anti-dsADN</p> <p>anti-centrómero, anti-Scl-70</p> <p>anti-Ro (SS-A), anti-La (SS-B)</p> <p>anti-RNP</p> <p>anti-Jo-1</p> <p>Factor Reumatoide</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>2. Enfermedades no reumáticas</b></li> <li>• Infecciones</li> <li>• Enfermedades gastrointestinales</li> <li>• Enfermedades pulmonares</li> <li>• Enfermedades endocrinas</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedades hemáticas</li> <li>• Enfermedades neoplásicas</li> <li>• Enfermedad del riñón en etapa final</li> <li>• Postransplante</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>3. Personas sanas</b></li> <li>• Embarazo</li> <li>• Personas mayores</li> <li>• Historial familiar con enfermedad reumática</li> <li>• Inducido por drogas</li> </ul>		

LES= Lupus Eritematoso Sistémico. EMTc= Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo. Sm= antígeno Smith  
 ADN= ácido desoxirribonucleico. Scl-70= Topoisomerasa I. SS-A o B= Síndrome de Sjögren antígeno A o B.  
 RNP= ribonucleoproteína Jo-1= antígeno histidina ARN sintetasa.



Dentro de las diferentes teorías que tratan de explicar la presencia de AAN la mas aceptada propone que la aparición de los anticuerpos antinucleares se debe a la pérdida de la tolerancia inmune. Este fenómeno aún es motivo de estudio. Hay varias alteraciones inmunológicas que lo explican, como son: a) pérdida del efecto supresor de los linfocitos T por cambios en la concentración de interleucinas entre ellas IL-2 e IL-10; b) incapacidad de depurar complejos inmunes y c) activación policlonal con el aumento de la concentración de todas las inmunoglobulinas.

La susceptibilidad de cada persona a sintetizar anticuerpos antinucleares es diferente y depende de varios factores, tales como: sexo, edad, factores genéticos, clase de complejo mayor de histocompatibilidad, factores ambientales e infecciosos, entre otros. Cabe mencionar que después de la quinta década de la vida, la presencia de AAN llega hasta un 30% de personas consideradas como normales.

Los anticuerpos antinucleares se cuantifican en el laboratorio utilizando diferentes técnicas. La más utilizada ha sido la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual proporciona información inicial acerca de la presencia o ausencia de anticuerpos antinucleares. Una vez que se ha demostrado que es positivo, se debería conocer la especificidad de los anticuerpos. Ya que como se mencionó anteriormente, hay una serie de diferentes patologías donde estos son positivos.

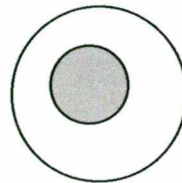
El propósito de este trabajo, es dar a conocer a los profesionistas que en alguna forma se involucran con pacientes con problemas inmunológicos, la importancia de la determinación de un perfil de AAN, pues hay ciertas especificidades de los anticuerpos asociadas a enfermedades, lo que hace que estos puedan considerarse como marcadores o que su presencia tenga cierto valor estadístico con cuadros clínicos bien establecidos.

## II. ANTECEDENTES

En 1970, aproximadamente 20 años después de la descripción del fenómeno de lupus eritematoso (células LE), se implementó la identificación de AAN usando tejidos tales leucocitos y riñón de ratón. En un principio solamente 4 sistemas antigénicos nucleares se asociaban con enfermedades reumáticas: aquellos que involucraban ácido desoxirribonucleico (ADN), histona, Smith (Sm) y nucleolo. Sin embargo, para 1980, la lista se había incrementado cinco años después el número descrito era mayor (cuadro 2). (Pisetsky, 1992; Illei, 1999).

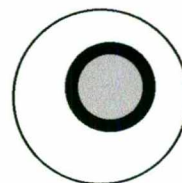
Al observar en el microscopio la reacción de cada especificidad de anticuerpo presenta diferentes patrones usando la técnica de inmunoperoxidasa. Éstos son los siguientes:

1. *Homogéneo* (“difuso” o “sólido”). Es la expresión morfológica de los anticuerpos anti-histona y anti-ADN, y se presenta en individuos con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) o Lupus Inducido por fármacos. En esta disposición, el núcleo muestra tinción difusa y uniforme.



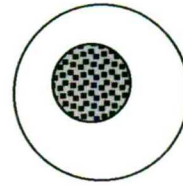
Homogéneo

2. *Periférico* (“piloso” o de “perfiles”). Es la expresión morfológica de anticuerpos anti-ADN de doble cadena. La disposición de los perfiles se aprecia mejor cuando se utilizan como sustrato los leucocitos humanos. Es característica de LES activo.



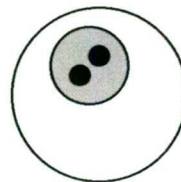
Periférico

3. *Granular o moteado*. Refleja la presencia de anticuerpos dirigidos contra constituyentes nucleares que no son ADN. La valoración de anti-antígeno nuclear extraíble (anti-ENA), detecta anticuerpos contra dos antígenos nucleares extraíbles, el Smith (Sm), que es característico de LES y el antígeno ribonucleoproteína (RNP) que en títulos altos caracterizan la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo.



Moteado

4. *Nucleolar*. Se origina por la tinción homogénea del nucleolo. Se ha sugerido que este antígeno puede ser el precursor ribosómico de la ribonucleoproteína. Esta relación se relaciona con esclerodermia o síndrome de sobreposición poliomiocitis-dermatomiositis.



Nucleolar



## CUADRO 2

### Anticuerpos antinucleares comunes en enfermedades reumáticas sistémicas

#### Especificidad de AAN

Anticuerpos contra ADN

Solo dsADN

ds y ss ADN

Solo ssADN

Anticuerpos contra histonas

Histonas

Anticuerpos contra antígenos no histona

Antígeno Sm

NRNP (U1RNP)

Antígeno SS-A/Ro

Antígeno SS-B/La

Scl-70

PCNA

PM-1

Jo-1

Anticuerpos contra antígenos nucleolares

4S-6S ARN específico del nucleolo

Otros ARN nucleolares y partículas de

ARN-proteína

#### Asociación con la enfermedad

LES

LES, raramente en otras enfermedades

LES, otras enfermedades reumáticas o no reumáticas

LEID (95%-100%), AR(15%-20%), y LES (30%-80%)

LES (15%-30%). anticuerpo marcador.

EMTC (95%-100%), menor frecuencia en LES y escleroderma

SjS(60%-70%), LES(30%-40%)

SjS(50%-60%), LES (10%-15%)

Escleroderma (15%-20%)

LES (2%-10%)

PM/Escleroderma sobrepuesto (87%), DM (17%)

PM (31%)

Escleroderma y ciertas enfermedades del tejido conectivo

Escleroderma primario

ds=doble cadena ss=cadena simple ADN=ácido desoxirribonucleico Sm=antígeno Smith RNP=ribonucleoproteína SS-A o B= Síndrome de Sjögren antígeno A o B. Scl-70= antígeno topoisomerasa I. PCNA=antígeno nuclear de células proliferantes. PM= polimiositis. Jo-1= Histidina ARNsitetas. ARN= ácido ribonucleico LES= Lupus Eritematoso sistémico. LEID=Lupus Eritematoso Inducido por Drogas. AR= Artritis Reumatoide EMTC= Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo. SjS=Síndrome de Sjögren. DM= Dermatomiositis

## **II.1 Especificidades de anticuerpos antinucleares**

### **Anticuerpos contra pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs)**

Los anticuerpos contra el antígeno Sm, fueron identificados por primera vez en 1966 por Tan y Kunkel (1966) utilizando inmunodifusión radial en un paciente de apellido Smith, mientras estudiaban la presencia de anticuerpos antinucleares en pacientes con LES y posteriormente, se encontraron en otro estudio de pacientes con LES anticuerpos contra la ribonucleoproteína (RNP) (Mattioli, 1970). Años más tarde, Lerner y Steitz (1979), demostraron que ambos antígenos estaban localizados en la partícula U1 snRNP, la cual es un complejo de ARN nuclear pequeño, compuesto por ARN U1 y polipéptidos asociados que llevan los determinantes antigénicos. Además de ser el blanco principal de la respuesta autoinmune en LES y enfermedad mixta del tejido conectivo, la U1 junto con una serie de partículas de pequeñas moléculas nucleares de ribonucleoproteína, son importantes en el procesamiento del ARN (Lerner, 1979; Pisetsky, 1992). Soportando estos hallazgos, investigaciones posteriores demostraron que todos los U snRNA, excepto U3, U8, U13 que se encuentran en el nucleolo, se localizan en el nucleoplasma e inmunoprecipitan con anticuerpos anti-Sm. Los U9 y U10 ARN son probables componentes de Sm/RNP, pero aún no habían sido caracterizados (Pisetsky, 1992).

Ambos anticuerpos anti-Sm y anti-U1 RNP, fueron identificados con técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa usando células Hep-2 como fuente de antígeno como un patrón granular fino, que pudiera verse en forma homogénea en diluciones bajas de suero conteniendo un alto título de AAN de esta especificidad. Este mismo patrón pueden dar los anticuerpos anti-U2 RNP que se describieron por primera vez en un paciente con síndrome de sobreposición escleroderma-polimiositis (Mimori, 1984). Siendo el patrón granular fino en inmunofluorescencia indistinguible de los anticuerpos anti-Sm y anti- U1RNP (Mimori, 1984; Pisetsky, 1992). Se pueden detectar por inmunodifusión, donde dan identidad parcial con suero control anti-SM (Mimori, 1984).



En un principio, para la detección específica de anti-Sm y anti-U1 RNP, se utilizó la técnica de doble difusión y recientemente se han desarrollado pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) que son más específicas y sensibles, para la detección de estos anticuerpos.

### **Anticuerpos contra ácido desoxirribonucleico (ADN)**

De todos los anticuerpos antinucleares, los anti-ADN son los más característicos de LES y son los principales mediadores del daño renal.

El ADN es una macromolécula compleja que puede encontrarse en su forma nativa o en doble cadena (ds) y que con el calentamiento puede dar origen al ADN desnaturalizado o de cadena simple (ss). Debido a que el dsADN puede estar contaminado con el ssADN y viceversa, la precisa valoración inmunoquímica de la antigenicidad de cualquier preparación dada para ADN, reporta los resultados con anti-ADN que implica la cuantificación de ambos. Ya que inclusive se ha observado una reacción cruzada para ambos anticuerpos, lo que sugiere que comparten epítopes entre ellos (Pisetsky, 1992).

Aunque por inmunofluorescencia estos anticuerpos característicamente se observan con un patrón homogéneo, pueden detectarse específicamente en el laboratorio por medio de la técnica de inmunofluorescencia utilizando como substrato *Crithidia luciliae*, que es un hemoflagelado fuente de ADN nativo (Balloy, 1986).

### **Anticuerpos contra SS-A/SS-Ro**

Los autoanticuerpos anti-Ro o SS-A se designaron con estas iniciales considerando las de un paciente que padecía enfermedad síndrome de Sjögren y en quien había tres sistemas diferentes de anticuerpo denominados A, B y C. Se pueden detectar mediante una variedad de técnicas en las que se incluyen la inmunodifusión de Ouchterlony, la inmunoprecipitación, el ensayo inmunoblot, y otras técnicas en fase sólida. Junto con la descripción de la inmunodifusión doble, se reportó la presencia de precipitinas en una pequeña proporción en pacientes con Síndrome de Sjögren (SS) (Pisetsky, 1992), para las cuales se usó el término

SjT. Las propiedades físicas y su presencia en LES y SjS hicieron concluir que el antígeno SjT, Ro ó SS-A son el mismo autoantígeno.

La purificación y caracterización del antígeno Ro se llevó a cabo por medio de inmunoblot. El antígeno se definió como un péptido simple de 50 a 60 Kd, obteniéndose secuencias de 60.7 Kd y de 57.5 Kd provenientes de clones aislados de ADN. Ambas secuencias son virtualmente idénticas, excepto por algunos aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (Pisetsky, 1992). Posteriormente, se definió un péptido adicional por inmunoblot, el cual migra a 52 KD y se ha encontrado que es ligado por muchos sueros que contienen precipitinas anti-Ro. Se ha reportado otro péptido de los extractos eritrocitarios, que migra a 54 KD por inmunoblot. De entre los sueros anti-Ro, se observó que los enlaces de éste péptido son casi completamente concordantes con los del péptido de 52 kD encontrado en los linfocitos, lo que conlleva a la sospecha de que los dos péptidos están relacionados estrechamente al nivel de su estructura primaria.

El antígeno Ro purificado, comúnmente compuesto de péptido de 60 kD y fragmentos de ARN, puede prepararse por medio de cromatografía en cantidades que llegan a los miligramos (Yamagata, 1984), por lo que sintetizado de esta forma, el antígeno puede utilizarse en pruebas de fase sólida.

Las asociaciones inmunogenéticas de anti-Ro con lupus, no han sido esclarecidas. Se ha reconocido anti-Ro relacionado con HLA-DR3 (Pisetsky, 1992) y con HLA-DR2 (Ahearn, 1982; Pisetsky, 1992). La asociación predominante es con HLA-DQ, considerando que el riesgo de enfermedad es en HLA-DR, o al menos algún otro que HLA-DQ en el haplotipo HLA-B8, DR3 (Pisetsky, 1992). Se ha reportado que la asociación más poderosa es con DQ y que casi todos los pacientes con anti-Ro tienen una glutamina en la posición 34 en la secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha$  de DQ y una leucina en la posición 26 de la cadena  $\beta$  de DQ (Reveille, 1991).

El papel de los linfocitos T ha sido de especial interés, no sólo en las respuestas de antígenos individuales sino también en la posible situación de patogénesis de la enfermedad y de la autoinmunidad.



Las asociaciones de anti-Ro con HLA y los alelos del receptor de la célula T, proveen una evidencia obligada para apoyar que la respuesta de autoanticuerpo está dada por un antígeno como mecanismo para la generación de autoanticuerpos anti-Ro, más que la activación policlonal no específica de células B. La activación policlonal de células B se ha propuesto como el mecanismo para la generación de autoanticuerpos de LES (Klinman, 1987).

Los anticuerpos anti-Ro, se han asociado con alelos de la región constante del receptor de la célula T en el gen B de los pacientes con lupus (Frank, 1990).

Por último, estudios realizados por Reichlin y colegas (1989ab) demostraron que existe un amplio espectro de especificidad para los antígenos Ro de diferentes especies.

Junto con las asociaciones de DQ y el receptor de célula T, la evidencia convincente de que el Ro humano es el antígeno, se apoya en que se conoce que un complejo trimolecular es el que se involucra en la generación de respuestas autoinmunes de anti-Ro. Esto está de acuerdo con el modelo en auge, para el control de respuesta heteroinmune incluyendo el involucro de HLA de clase II y el receptor de célula T en regulación inmune. Si esto es cierto, entonces el autoantígeno Ro podría interactuar con muchos de los patrones e interacciones moleculares del sistema inmunorregulador como si fuera un antígeno extraño ordinario.

### **Anticuerpos contra SS-B/La**

Estos anticuerpos comparten muchas características con los anticuerpos anti-Ro. Aunque no se ha demostrado que medien directamente el daño tisular, los anticuerpos anti-SS-B son un producto del complejo de alteraciones inmunorreguladoras fundamentalmente de la enfermedad autoinmune.

En la mayoría de los sueros de los pacientes, los anticuerpos anti-SS-B expresan ambas cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ , indicando una respuesta policlonal de células B más que una respuesta oligoclonal (Pisetsky, 1992).



En los sueros de pacientes con LES y SjS, la clase de IgG predominante es la IgG1, con niveles mucho menores de IgG3 y con IgG2 e IgG4 virtualmente no detectables (Pisetsky, 1992).

Los anticuerpos anti-SS-B reaccionan con tres regiones no sobrepuestas en la región amino (A), media(C), y carboxilo (D) en la molécula La humana. La inmunoafinidad de los anticuerpos anti-La A, anti-La C y anti-La D no presentó reacción cruzada con ninguno de los fragmentos de La; de aquí que, estas reactividades representan poblaciones independientes de anticuerpos (Pisetsky, 1992).

### **Anticuerpo Scl-70 ( Topoisomerasa I)**

El anticuerpo contra la enzima topoisomerasa I se detectó por primera vez utilizando inmunodifusión doble. El antígeno se denominó Scl-70 debido a que su reactividad era específica para algunos sueros de pacientes con esclerodermia el cual tenía un peso molecular de 70 K Da cuando se llevó a cabo la extracción tisular del antígeno. En 1986, Shero y cols. identificaron el Scl-70 como topoisomerasa I, la cual es una enzima que se encarga de catalizar la relajación de la superhélice del ADN. Es estable durante el ciclo celular y puede tener una función en la transcripción de genes de ARN ribosomal humano.

Diversos estudios de los epítopes de la topoisomerasa I han confirmado que los sueros anti-topoisomerasa I reconocían una región cercana al sitio activo del enzima. Maul (1983), quien fuera el que confirmó esta suposición, encontró que 9 sueros de pacientes reconocían un nonadecapéptido que contenía 11 residuos de esta región de la topoisomerasa I pero rodeado por 8 residuos no relacionados a la topoisomerasa I. Este péptido contiene un trecho de 6 residuos encontrado también en la molécula p30 en el virus de sarcoma felino (Jarzabek-Chorzelska, 1986). Los autores propusieron que los anticuerpos antitopoisomerasa I surgen como respuesta a una reacción cruzada durante el curso de una infección viral.

Se han comparado 4 métodos para la detección de antitopoisomerasa I; ELISA, inmunoblot, difusión doble e inhibición de la actividad enzimática de la

topoisomerasa I (Hildebrandt, 1990). La difusión en gel identificó la presencia de anticuerpo en 19 pacientes mientras que ELISA identificó 31 e inmunoblot 36, lo que hizo concluir que el Western blot y ELISA son mucho más sensibles que difusión doble por lo que cualquiera de estos métodos deberá usarse en la prueba inicial. Este resultado era de esperarse considerando estudios hechos con otras sistemas. Sin embargo, hay que tener en mente que mientras el antígeno no se tenía cuando menos parcialmente purificado, es la técnica de doble difusión lo que ha permitido identificar diferentes sistemas de anticuerpos. Juárez (1988), encontró que todos los sueros positivos por inmunodifusión eran positivos en inmunoblot así como en ELISA y también en inhibición de actividad enzimática. Utilizando la inhibición de la actividad enzimática como un verdadero positivo, se encontró que la sensibilidad del ensayo de difusión en gel es de 79% y especificidad de 100%; la sensibilidad de ELISA es 100% y especificidad de 98%, la sensibilidad de Western blot es 100% y especificidad de 97%.

### **Anticuerpos anti-histona (AAH)**

Las histonas son proteínas pequeñas unidas al ADN, ricas en aminoácidos, y representan el componente proteico más abundante en el núcleo de células eucariotas. Las histonas se clasifican en: histonas H1, H2A, H2B, H3 Y H4. Las histonas y el ADN se asocian para formar las unidades básicas de la cromatina y nucleosomas. Dos moléculas de cada histona; H3 y H4 forman un tetrámero central  $(H3-H4)_2$  flanqueado por dos dímeros de H2A-H2B. El octámero resultante, compuesto de dos moléculas de cada tipo de histona, se asocia con aproximadamente 146 pares de bases de ADN que están enrolladas en superhélice alrededor de las histonas para formar una partícula central de nucleosoma.

Los anticuerpos anti histona (AAH), son tan abundantes como su contra parte anti-ADN en enfermedades reumáticas (Rubin, 1987). Sin embargo, a pesar de su importancia y frecuencia en algunos síndromes clínicos, los AAH no han recibido la atención que se les ha dado a otros anticuerpos antinucleares. La razón por la que existen muchas discrepancias en los reportes de los estudios de



estos anticuerpos, es la dificultad de purificar las histonas, las cuales en las pruebas, generalmente se encuentran contaminadas con proteínas no histona o con ADN. Se han realizado estudios que utilizan técnicas poco confiables para determinar la actividad de los AAH tales como inmunofluorescencia utilizando núcleos extraídos con ácido y reconstituidos con varias fracciones de histona. Los métodos que son más seguros y sensibles se llevan a cabo en fase sólida, los cuales incluyen inmunoblot, ELISA y radioinmunoensayo.

Debe hacerse énfasis en que las proteínas se desnaturalizan frecuentemente por el proceso de electroforesis-electroblot, de ahí que los epítopes de las histonas que dependen de la estructura conformacional no se reconocerán en esta prueba. Esto puede llevar a discrepancias en la especificidad de AAH cuando se comparan los resultados de inmunoblot con los de ELISA. (Pisetsky, 1992)

### **Anticuerpos contra antígenos nucleolares.**

Se han identificado algunos antígenos nucleolares.

*RNA polimerasa I.* El RNA polimerasa es un complejo enzimático que transcribe el código de moléculas precursoras del ARN ribosomal (ARNr) (Reimer, 1987). Usando polimerasa I de conejo se encontró que el antígeno se localiza en una distribución nucleolar puntual en células de interfase y sugieren que estas áreas contengan complejos transcripcionales de ARN polimerasa I y genes de ARNr (Scheer, 1984). Durante la mitosis, el antígeno localizado en la región organizadora nucleolar cromosomal y genes de ARNr transcripcionalmente activos se encontraron en los centros fibrilares nucleolares usando inmunocitoquímica microscópica.

*Fibrilarina.* Esta proteína se detectó por primera vez por su reacción en suero de pacientes con esclerodermia. El epítipo de fibrilarina reconocido por el anticuerpo humano se detecta en el nucleolo de animales y plantas (Reimer, 1988).

*PM-Scl.* Es un antígeno presente en el nucleolo y en el nucleoplasma (Reimer, 1990; Tan, 1989). Este antígeno consiste de un complejo proteínico de 11 unidades, las cuales tienen un peso molecular entre 110 a 20 kDa.

### **Anticuerpos anticentrómero.**

Los anticuerpos anticentrómero (AAC) se describieron por primera vez en 1980 por Moroi y colaboradores (1980). Estos anticuerpos se encontraron en algunos pacientes con esclerodermia, particularmente aquellos que sufrían calcinosis, fenómeno de Raynaud y CREST (Catoggio, 1983; Fritzler, 1980; Kallenberg, 1982; Moroi, 1980; Tan, 1980). El significado clínico específico que mejor se correlaciona con la presencia de ACA es el fenómeno de Raynaud (Catoggio, 1983; Earnshaw, 1986; Fritzler, 1980; Tan, 1980).

Existen 3 antígenos centroméricos reconocidos: CENP-A (17kDa), CENP-B (80kDa) y CENP-C (140kDa) (Earnshaw, 1985). El primero, CENP-A, es una proteína de bajo peso molecular, la cual usando inmunofluorescencia se encuentra depositada cerca del dominio más expuesto del cinetocoro, por lo que se deduce que puede jugar un papel en la función del cinetocoro durante la mitosis. En un estudio que realizó Palmer y cols. (1991), se encontró que CENP-A tiene secuencias muy parecidas a las regiones de H3 mientras que otros segmentos de CENP-A no se relacionan con esta histona o a cualquier otra.

CENP-B es un antígeno centromérico más abundante y parece ser reconocido por todos los sueros que contienen AAC. Este antígeno es una proteína de unión del ADN que se une a una secuencia de 17 pares de bases en el  $\alpha$ ADN (Masumoto, 1989). Algunos estudios de los cromosomas utilizando inmunofluorescencia y anticuerpos específicos contra CENP-B revelaron que existen niveles de variación del antígeno dependiendo del cromosoma (Earnshaw, 1987). Debido a que CENP-B es una proteína de la cadena  $\alpha$  del ADN rica en heterocromatina, no es de sorprenderse que la proteína se observe en niveles variados dependiendo del cromosoma debido a que la cadena  $\alpha$  del ADN exhibe tal variabilidad. CENP-B se detecta en la heterocromatina directamente junto al cinetocoro en una banda que se extiende al interior del centrómero (Cooke, 1990).



CENP-B es un objetivo importante en la inhibición mitótica causada por la inyección de suero autoinmune (Bernat, 1990; 1991).

CENP-C es la proteína centromérica más pesada y se ha demostrado que está ausente en el centrómero inactivo de un cromosoma dicéntrico estable por lo tanto, se requiere para la actividad del cinetocoro (Earnshaw, 1989). Se localiza en el collar del kinetochore. Se encontró anti-CENP-C en 37 de 39 sueros con AAC (Earnshaw, 1986).

El significado clínico de los AAC depende en el método utilizado para su detección. Si se utiliza inmunofluorescencia usando células HEp-2, se encontrará como patrón granular. Si se utiliza algún extracto de tejido no se observará el patrón centromérico. Por lo tanto, es importante evaluar la presencia de estos anticuerpos para requerir la prueba específica de anticuerpos anti-centrómero. Una prueba de AAN llevada a cabo en forma rutinaria no descarta la presencia de AAC.

Raramente se encuentran AAC en pacientes que no padecen síndrome de Raynaud con o sin enfermedad de tejido conectivo. Se han encontrado AAC en pacientes con síndrome de Raynaud y síndrome de Sjögren, pacientes con síndrome de Raynaud y tiroiditis de Hashimoto, y en pacientes con síndrome de Raynaud y artritis reumatoide (Earnshaw, 1986; Weiner, 1988). Las mujeres son más susceptibles a presentar AAC que los hombres.

El inmunoblot no es más sensible que IFI para detectar AAC, pero es capaz de distinguir entre las reacciones de CENP. No hay justificación clínica para usar esta técnica ya que es más difícil y lleva más tiempo.

La proteína de fusión CENP-B recombinante usada en ELISA es un poco más sensible que IFI. La técnica de ELISA es más sencilla y puede analizar mayor cantidad de sueros en un tiempo determinado. (Rothfield, 1987; Weiner, 1991)



## **Antígeno nuclear de células proliferantes.**

La transición de la quiescencia a la síntesis de ADN en el ciclo de la célula eucarionte involucra la síntesis de proteínas reguladoras y proteínas asociadas directamente con la maquinaria de la replicación del ADN. El antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA)/ciclina la cual se conserva muy bien durante la evolución (Susuka, 1991), puede tener un lugar crucial entre estas dos categorías de proteínas. Se descubrió, por medio de técnicas de inmunofluorescencia, como un autoantígeno asociado con sitios de la replicación del ADN en el núcleo de las células proliferantes; y como una proteína (separada por electroforesis en gel en dos dimensiones) sintetizada durante la fase tardía G<sub>1</sub> y fase S en respuesta a los mitógenos (Miyachi, 1978; Mathews, 1984; Bravo, 1986).

Posteriormente se identificó al PCNA/ciclina como la proteína auxiliar de la  $\delta$ ADN polimerasa (Prelich, 1987; Bravo, 1987), la cual sintetiza la cadena madre del ADN (Bambara, 1991). Se demostró que la PCNA se acumula en sitios de síntesis de ADN, en un complejo de pre-iniciación, casi 15 minutos antes de que la replicación comience (Kill, 1991). Por medio de la interacción con el complejo proteína 1 activadora (RF-C) – ADN cebado, el PCNA parece regular la unión de  $\delta$ ADN polimerasa (Lee, 1990; Shivji, 1992).

### **III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

- Demostrar la presencia de anticuerpos antinucleares de diferente especificidad en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes.

#### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Investigar la utilidad de la determinación de diferentes anticuerpos antinucleares específicos en un suero positivo.

## V. RESULTADOS

### Anticuerpos antinucleares por inmunoperoxidasa

De los 25 sueros estudiados, trece resultaron reactivos a anticuerpos antinucleares y el resto fueron negativos. Los patrones observados (cuadro 5) fueron: mixto cinco (figura 1), moteado o granular tres (figura 2), nucleolar tres (figura 3), y homogéneo dos (figura 4).

Otro patrón de interés no observado fue el centrómero (figura 5).

### Especificidad de los anticuerpos antinucleares por ELISA

Las dos muestras que resultaron positivas con patrón homogéneo por inmunoperoxidasa fueron positivas para anticuerpos contra ADN por ELISA. De las tres muestras en que se observaron anticuerpos contra el nucleolo, dos tuvieron especificidad contra Scl-70. En una de ellas no se pudo identificar ninguna especificidad. Las muestras con anticuerpos reportados como moteados o granulares, los anticuerpos fueron contra Sm y RNP en uno, RNP y SS-B en otro y en el último contra SS-B y Sm. De los reportados como patrón mixto en dos se pudieron identificar anticuerpos contra Sm, en uno SS-A y SS-b. En otros dos, no se pudieron identificar anticuerpos ya previamente descritos, y en otro anti-RNP.



**CUADRO 4**

**Reactividad Antigénica de AAN**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Patrón observado por IFA indirecta</b>	<b>Otras pruebas utilizadas para detectar el anticuerpo</b>
<b>Anti- ADN(doble cadena)</b>	<i>Periférico, homogéneo o ambos</i>	<i>RIA, ID, CIE, EIA</i>
<b>anti- ADN(cadena simple)</b>	<i>Periférico, homogéneo o ambos</i>	<i>RIA, ID, CIE, EIA</i>
<b>Histona (H1, H2A, H2B, H3, H4)</b>	<i>Homogéneo, Periférico o ambos</i>	<i>IF especial, RIA, EIA</i>
<b>Histona (H3)</b>	<i>Variable en manchas.</i>	<i>RIA, EIA</i>
<b>Smith (Sm)</b>	<i>Moteado</i>	<i>ID, CIE, EIA</i>
<b>RNP nucleares</b>	<i>Moteado</i>	<i>ID, CIE, EIA</i>
<b>Sci-70</b>	<i>Moteado Atípico</i>	<i>ID</i>
<b>SS-A (Ro)</b>	<i>Negativo</i>	<i>ID, EIA, CIE utilizando extracto de bazo y timo humano</i>
<b>SS-B (La, Ha)</b>	<i>Moteado</i>	<i>ID, EIA, CIE</i>

ADN= ácido desoxirribonucleico RNP=ribonucleoproteínas Sci70= topoisomerasa I SS-A o B= Síndrome de Sjögren antigéno A o B  
 IFA= inmunofluorescencia indirecta RIA=Radioinmunoensayo ID= Inmunodifusión CIE= Contrainmunoelctroforesis EIA= Ensayo  
 inmunoenzimático

La principal razón para ordenar una prueba de inmunoperoxidasa es para confirmar el diagnóstico clínico de una enfermedad reumática sistémica tal como LES.

La habilidad de realizar una prueba confiable depende de diversos factores técnicos, uno de los más importantes es la elección de sustratos (Molden, 1984; McCarty, 1984; Beutner, 1972).

La técnica consiste en fijar en una placa el sustrato que contiene los antígenos nucleares, los cuales pueden ser secciones de riñón de animal o cultivos de células de epitelio humano (HEp-2). Una vez fijado el sustrato, se coloca la muestra sobre él y se incuba durante un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Pasado ese tiempo, se elimina el exceso de suero y se coloca la inmunoglobulina anti-humana conjugada con peroxidasa y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lava el exceso de inmunoglobulina anti-humana y se agrega el sustrato de la enzima,  $H_2O_2$ . Se lava la laminilla 3 veces y se coloca un cubreobjetos sobre la laminilla y se examinan en el microscopio. (Apéndice VIII.I)

La reactividad antigénica de los diferentes tipos de anticuerpos antinucleares y el patrón que presentan se presentan en los cuadros 3 y 4. (Molden, 1984; Nakamura, 1984; McCarty, 1984; Notman, 1975; Tan, 1982).

## **IV. 2 Ensayo inmunoenzimático**

Los reactivos y el procedimiento de esta técnica son aplicables para medir los anticuerpos presentes en plasma, suero y otros fluidos, tales como espinal, pleural o sinovial, así como en medios de cultivo celulares. Los ensayos de fase sólida han empezado a reemplazar los ensayos convencionales para anti-ADN y anti-histona. Muchas macromoléculas (excepto ADN nativo) se unen rápidamente a microplatos de poliestireno. Puede lograrse que el ADN nativo se una al poliestireno ya sea directamente, en regiones limitadas en la cadena simple; o a través de un pre-cubierta de proteína-polipéptido básica en la pared del vaso. Si



## **IV. METODOLOGÍA**

Se usaron sueros de pacientes con LES, los cuales fueron positivos para la presencia de anticuerpos antinucleares en laboratorios clínicos de rutina.

La dilución inicial será de 1:40 usando solución amortiguadora de fosfatos. Se ha demostrado que a esta dilución los anticuerpos antinucleares normalmente son negativos a excepción de personas mayores de 50 años en quienes hasta un 30 por ciento de los casos pueden ser positivos, por lo tanto, se usaron 25 sueros provenientes de pacientes cuyas edades se encuentran entre 20 y 50 años. Se descartaron todas aquellas muestras que se observaron contaminadas. Una vez tomado el suero, la muestra se conservó en congelación a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Como fuente de antígenos nucleares tuvimos células HEp-2 usando peroxidasa como indicador. El equipo para la determinación de AAN fue Colorzyme (Immuno Concepts, N.A. Ltd., Sacramento CA USA).

### **IV.1 Técnica de inmunoperoxidasa para anticuerpos antinucleares**

La técnica de inmunoperoxidasa se basa en el mismo principio que la técnica de inmunofluorescencia. A diferencia de la última, en esta técnica la inmunoglobulina anti-humana está conjugada con peroxidasa, en lugar de fluoresceína, y se produce una reacción de color al añadir el substrato y un agente oxidante como es el agua oxigenada o el ácido clorhídrico.

La ventaja de esta técnica es que se utiliza un microscopio de luz, en lugar del microscopio de fluorescencia y que las muestras pueden guardarse por años para su análisis posterior. Esta técnica nos proporciona buena sensibilidad, reproducibilidad y un procesamiento relativamente fácil (Molden, 1984; Nakamura, 1984). Muchos laboratorios utilizan primero esta técnica para rastrear la presencia de AAN en un suero antes de utilizar otras técnicas tales como inmunodifusión, contrainmunolectroforesis, radioinmunoensayo y los inmunoensayos enzimáticos, que son utilizados para definir la especificidad del anticuerpo (McCarty, 1984).



una anti-inmunoglobulina conjugada con una enzima se utiliza como reactivo detector, se previenen muchos problemas de seguridad y disponibilidad asociados con los radioisótopos. Estos ensayos, ELISAs, son versátiles ya que permiten que una variedad de inmunoglobulinas de clase específica o anticuerpos que unen complemento se utilicen como reactivos detectores.

El principio del ensayo es que el antígeno esté fijado en la pared de un microplato en el cual se colocará el suero humano problema. Una vez que haya ocurrido la unión del antígeno con el anticuerpo presente en el suero, se añade una inmunoglobulina anti-humana con peroxidasa. Se agrega peróxido y un substrato secundario para formar un cromógeno mediante la acción enzimática de la peroxidasa. Se determina la densidad óptica de los contenidos de cada pozo y esos valores se utilizan como medidas de la cantidad de un anticuerpo específico unido a las paredes. (Noel, 1986) (Apéndice VIII.2)

### CUADRO 3

#### Reactividad Antigénica de AAN

Anticuerpo	Antígeno
1. Anti- ADN(doble cadena)	ADN nativo (determinante desoxirribosafato)
2. anti- ADN(cadena simple)	ADN desnaturalizado (determinantes nucleotídicos de purina o pirimidina)
3. anti-Histona	H1, H2A, H2B, H3, H4
4. anti-Smith (Sm)	Antígeno Sm
5. anti-RNP nucleares	Ribonucleoproteína
6. anti-Scl-70	Topoisomerasa I
7. anti-SS-A (Ro)	Antígeno SS-A ó Ro (péptido de 60kD y fragmentos de ARN)
8. anti-SS-B (La)	Antígeno SS-B ó La
9. anti-nucleolar	ARN polimerasa I, fibrilarina y PM-Scl

ADN= ácido desoxirribonucleico RNP=ribonucleoproteínas Scl70= ribonucleoproteínas Scl70= topoisomerasa I SS-A o B= Síndrome de Sjögren antígeno A o B ARN= ácido ribonucleico.

CUADRO 5

Patrones encontrados en los sueros positivos con la prueba de inmunoperoxidasa

<i>Muestra</i>	<i>Patrón</i>	<i>Título</i>	<i>Especificidad</i>
1	Homogéneo	>1:320	ADN, Sm
2	Homogéneo	>1:320	ADN
3	Nucleolar	1:160	Scl-70
4	Nucleolar	1:80	Scl-70
5	Mixto	1:40	SS-A SS-B
6	Granular	1:80	SS-B Sm
7	Granular	>1:320	RNP SS-B
8	Granular	>1:320	RNP Sm
9	Nucleolar	1:40	SS-A
10	Mixto	1:40	Sm
11	Mixto	1:40	RNP
12	Mixto	1:40	
13	Mixto	1:40	

ADN= ácido desoxirribonucleico, Sm= antígeno Smith, RNP = ribonucleoproteína, SS-A y SS-B= antígeno A y B del síndrome de Sjögren, Scl-70= Topoisomerasa I



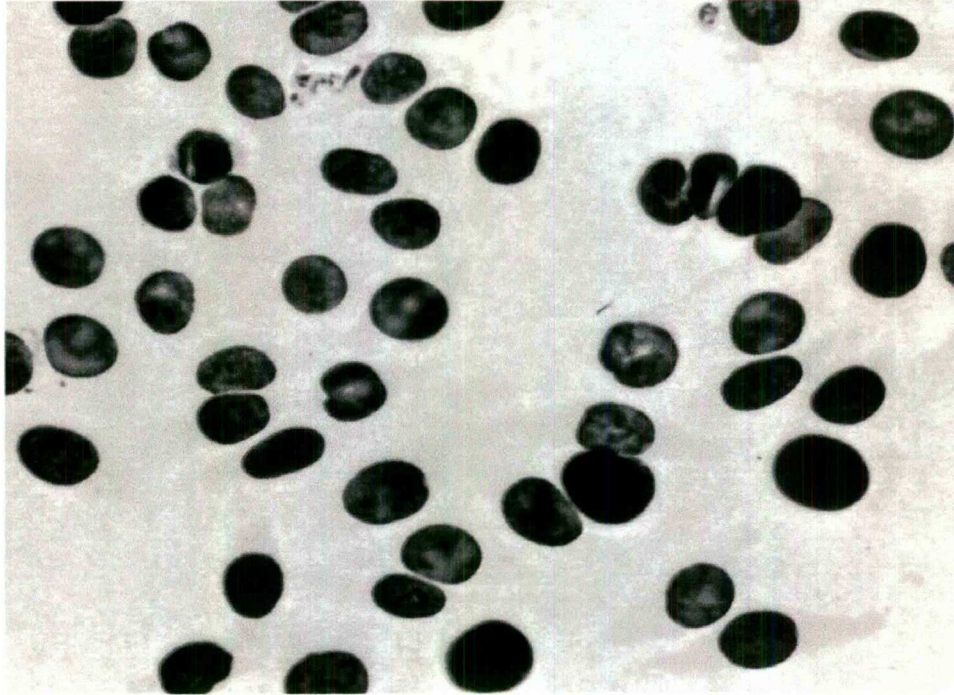


Figura 1. Patrón mixto. Se pueden observar células que presentan patrón homogéneo y nucleolar. Este patrón no es específico para una enfermedad en particular. Aumento 10X

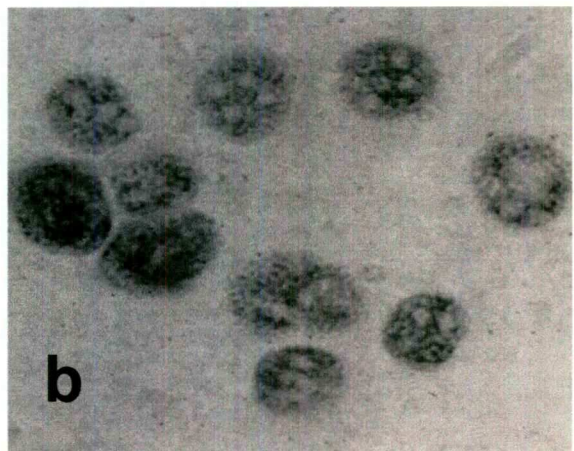
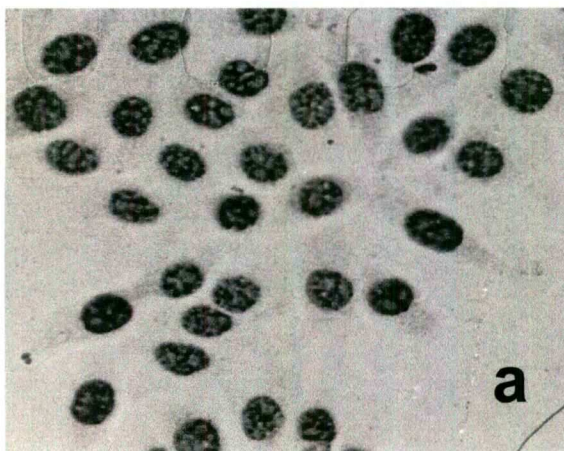


Figura 2. Patrón granular o moteado. Se presenta en LES y EMTC. Recuadro a: aumento 10X. Recuadro b: aumento 40X.

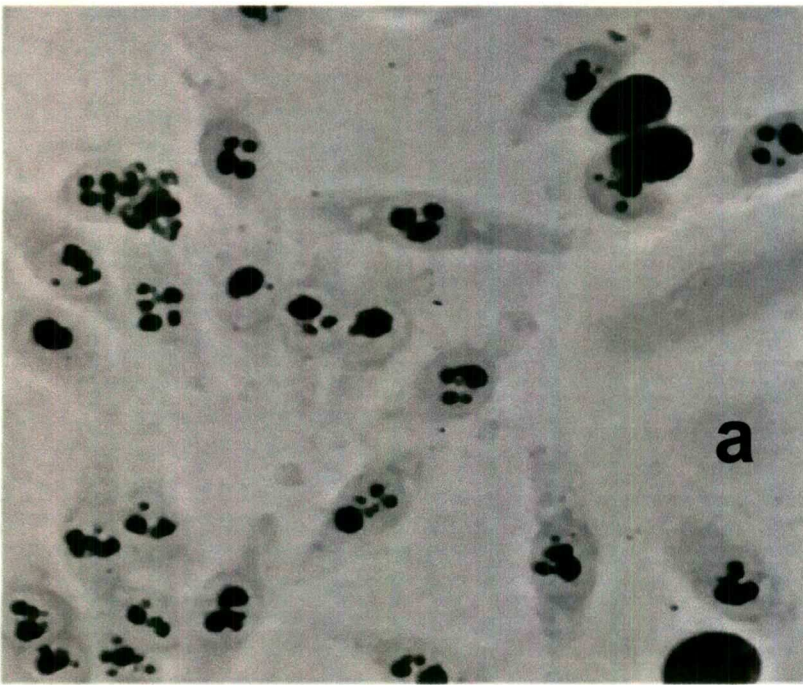


Figura 3. Patrón nucleolar. No tiene una especificidad única pero cuando se presenta en título muy elevado se relaciona con esclerodermia. Recuadro a: aumento 10X. Recuadro b: aumento 40X.



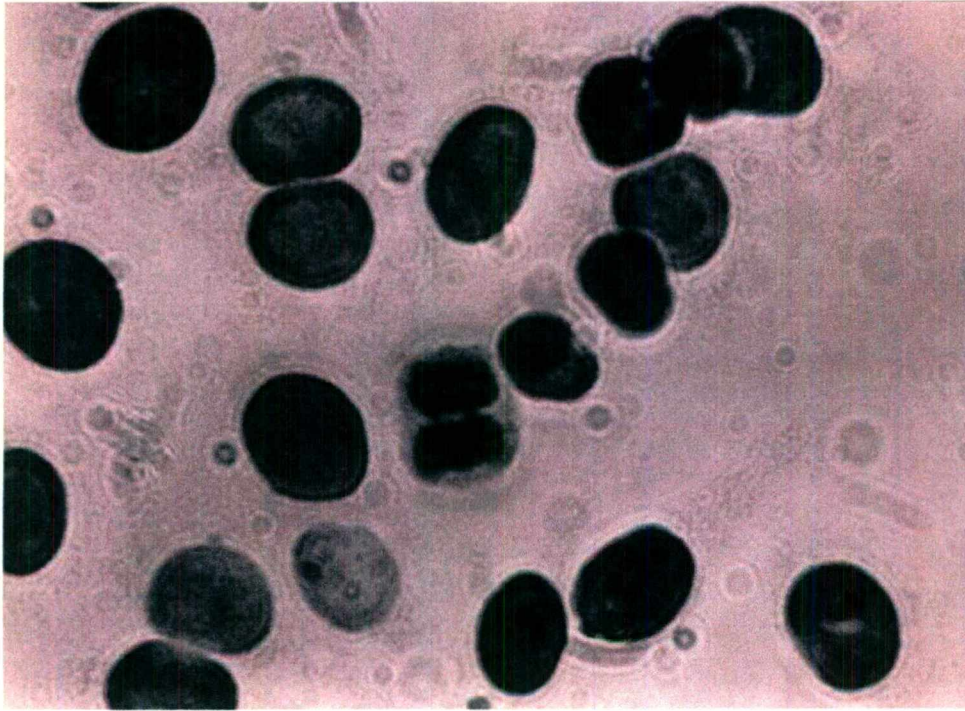


Figura 4. Patrón homogéneo. Este patrón está dirigido contra el ADN y la enfermedad con la que comúnmente se relaciona es con LES.

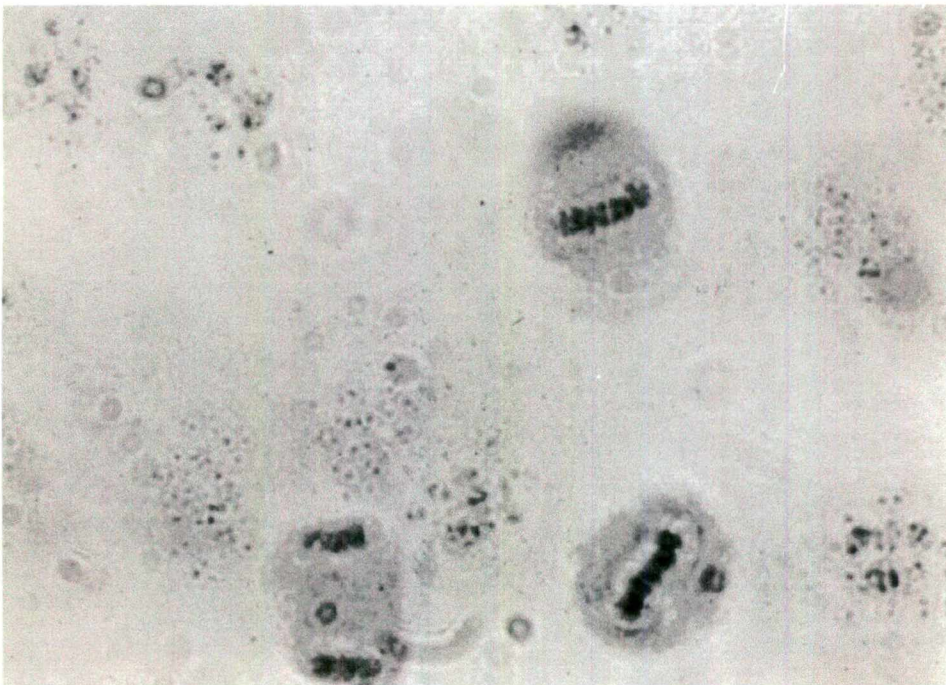


Figura 5. Patrón centrómero. Aumento 40X.



## VI. DISCUSIÓN

Todos los pacientes cuyos sueros fueron analizados en este trabajo tienen como diagnóstico LES. El patrón característico de esta enfermedad es el homogéneo con o sin moteado o moteado únicamente. Sin embargo, se encontró la presencia de otro tipo de patrones que probablemente definen otras enfermedades dentro de las consideradas como sistémicas reumáticas. Las muestras utilizadas en este estudio, fueron obtenidas de laboratorios de análisis clínicos en los que la investigación de anticuerpos antinucleares de pacientes con LES, había sido positiva por inmunofluorescencia. De las 25 muestras, únicamente en trece se demostró la presencia de anticuerpos antinucleares usando inmunoperoxidasa. De las trece muestras, en nueve fue posible identificar la especificidad de los AAN utilizando ELISA.

Comúnmente se correlaciona LES con la expresión de AAN, especialmente con anti-ADN. Sin embargo, la actividad serológica y clínica puede disociarse en algunos pacientes ya que sólo algunas especificidades de anti-ADN son patogénicas y muestran las propiedades inmunoquímicas para promover la deposición renal y daño inflamatorio subsecuente. Los anticuerpos reactivos principal o exclusivamente con ADN nativo manifiestan una relación muy marcada con LES, mientras que la especificidad dirigida contra determinantes que se encuentran en el ADN de cadena simple, tiene poco significado diagnóstico ya que se encuentra en una variedad de enfermedades autoinmunes y del tejido conectivo (Pisetsky, 1992).

El patrón homogéneo se encontró únicamente en dos de los sueros. Se identifica este patrón al observar una coloración sólida en el núcleo de la célula con o sin aparente encubrimiento del nucleolo. La región cromosómica de la célula mitótica en metafase es claramente positiva con una intensidad ligera o periférica mayor que, o igual que, el núcleo en interfase (figura 4). Los antígenos nucleares que presentan este patrón son ADN, DNP, histona. Se asocia con LES si se encuentra en títulos muy altos y cuando es menor el título, es sugestivo de LES o de otras enfermedades del tejido conectivo (Illei, 1999).

El patrón nucleolar se encontró en tres de los sueros que resultaron reactivos a AAN. Este anticuerpo presenta un patrón distinto al homogéneo. Al microscopio se observan manchas dentro del núcleo, generalmente menos de 6 manchas por célula. La región no cromosómica de las células en mitosis muestra una fuerte coloración, mientras que la región cromosómica presenta coloración débil (figura 3). Este anticuerpo está dirigido contra diferentes antígenos nucleolares tales como la RNA polimerasa I, la fibrilarina y el PM-Scl. Aunque estos 3 antígenos difieren en características y manifestaciones clínicas, se encuentran generalmente en personas que padecen esclerodermia, siendo el primero el más específico, por lo que se considera característico de la enfermedad (Pisetsky, 1992).

El patrón granular o moteado se encontró en tres del total de sueros reactivos a AAN. Este patrón lo presenta la reacción de anticuerpos dirigidos contra constituyentes no nucleares que no son ADN. Estos pueden ser anti-Sm o anti-RNP. El primero se encuentra en pacientes con LES y el segundo, cuando la concentración es muy elevada, define la enfermedad mixta del tejido conectivo, pero también se encuentra en aproximadamente del 30% al 40% de los pacientes con LES. Otro antígeno nuclear que presenta este patrón es el Scl-70 el cual está presente en personas que padecen esclerodermia (Pisetsky, 1992). Al microscopio se observa una coloración fina o granulosa del núcleo generalmente sin coloración en el nucleolo. La región no cromosómica de las células en mitosis en metafase presenta una coloración muy fuerte mientras que la región cromosómica está débilmente coloreada (figura 2).

Estos patrones fueron claramente identificados comparando la coloración que presentaron con el patrón control positivo utilizado gracias a que la tinción se llevó a cabo de manera adecuada y siguiendo las recomendaciones de control de calidad que establece la compañía de estos kits. Especialmente se tuvo cuidado en que los reactivos estuvieran bien preparados, almacenados y no caducos. Se identificaron con nombre, fecha de elaboración y fecha de caducidad. Esto es muy importante ya que la reacción depende de las condiciones de los reactivos. La limpieza del material también es muy importante en este tipo de análisis y se debe



evitar por completo la contaminación cruzada de todos los reactivos y muestras a evaluar. Esto se comprobó cuando en alguna ocasión durante el análisis, el duplicado de una muestra no parecía tener un patrón claro mientras que en la otra laminilla, se observaba claramente el patrón intenso y característico de reacción antinuclear.

Algo difícil de interpretar es la discrepancia con la positividad de los AAN obtenida por inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Esta segunda técnica, ha sido reportada tener la misma especificidad y sensibilidad que la IFI por lo que tendremos que asumir que en alguna forma por la técnica de inmunofluorescencia que usó uno de los laboratorios clínicos, hubo reporte de falsos positivos. El estudio posterior de las muestras por otro laboratorio haciendo IFI, reportó datos semejantes a los que se presentan en este trabajo. En cuanto al patrón, no podemos hacer ningún comentario, ya que la información recibida fue de que las muestras eran positivas para AAN, sin tener el patrón específico observado.

Para conseguir una buena interpretación de los resultados el control de calidad en la prueba de inmunoperoxidasa es una parte esencial. En cada laminilla se tiene una celda especial para el control positivo, negativo y el blanco de PBS. El control positivo deberá mostrar una coloración azul púrpura en el núcleo de las células, con el patrón característico del suero control utilizado. El control negativo deberá mostrar una coloración azul púrpura muy tenue en el citoplasma y núcleo, pero sin ningún patrón característico. El control del amortiguador de fosfatos (PBS) se utiliza para observar una coloración no específica producida por el reactivo de anticuerpo-enzima y no deberá exhibir coloración azul. Si los controles no aparecen como se describe, entonces los resultados no son válidos y se deberá repetir la prueba.

Para reportar los resultados se lista la última dilución en la cual el patrón es claramente visible. Cuando existe una reacción fuerte en la dilución 1:2560, se reporta como mayor que 1:2560. Los títulos 1:40 y 1:80 se consideran títulos bajos; 1:160 a 1:320 se consideran títulos medios, y 1:640 y mayor se consideran títulos altos.



Las células mitóticas son útiles para diferenciar patrones que pudieran confundirse, por ejemplo, el homogéneo con un granular difuso. En este caso la célula mitótica en el patrón homogéneo presentará una fuerte coloración en la región cromosómica de la célula en mitosis, mientras que en el patrón granular, la región fuera de los cromosomas mostrará una reacción moteado fino. Existen otros casos en los cuales se puede diferenciar ciertos patrones gracias a la coloración que presentan las células en mitosis, lo cual es una gran ventaja sobre otras técnicas en las cuales no se puede diferenciar (utilizando como substrato cultivo de tejido animal), o que incluso no puede observarse adecuadamente el patrón.

El estudio adicional de la especificidad del AAN que es motivo del presente trabajo, nos muestra varios aspectos fundamentales. El primero, es que no en todas las muestras positivas, es posible identificar uno de los anticuerpos plenamente descritos, por lo que queda aún mucho por hacer en este campo. Segundo, que es posible que debido al conocimiento de la especificidad de los AAN, no todos los pacientes tengan LES, sobre todo considerando aquellos en los cuales el patrón de inmunoperoxidasa se reporta nucleolar y la especificidad como Scl-70. Es posible que estos pacientes correspondan al grupo conocido como de esclerodermia o enfermedad afín con ésta.

Además de lo arriba mencionado, no hay la menor duda de que de las trece muestras estudiadas, tres de ellas independientemente del patrón reportado, la especificidad corresponde a Sm que se ha descrito como un marcador encontrado únicamente en pacientes con LES. En otras dos muestras en que tenemos anticuerpos contra RNP y SS-B, es posible que correspondan a pacientes con síndrome de Sjögren y lupus y/o con enfermedad mixta del tejido conectivo.

Estas observaciones, son por sí solas importantes para sustentar lo fundamental que es el determinar la especificidad de los AAN en toda muestra en que éstos se reportan como positivos cuando se hace la prueba de tamizaje.

Es fácil entender que en ocasiones esto no es posible debido al costo de las pruebas de laboratorio o que éstas no se hagan de manera rutinaria en el sitio donde se pidan los AAN. Sin embargo, teniendo el conocimiento de la posibilidad

de tener un diagnóstico con una sola prueba y que éste pueda ser cambiado en el momento en que se solicita la especificidad del anticuerpo, además del costo beneficio que pueda tener un paciente al ser tratado correctamente, este tipo de estudio deberá ser parte del arsenal de pruebas de laboratorio de todo médico que ve pacientes con enfermedades sistémicas reumáticas.

## **VII. CONCLUSIÓN**

Es relevante la importancia de la determinación de un perfil de anticuerpos antinucleares ya que la buena identificación de los patrones que manifiestan estos anticuerpos llevará al médico a diagnosticar la enfermedad reumática que se padece, considerando las manifestaciones clínicas, y así proporcionar un mejor tratamiento de control y seguimiento de la enfermedad.

El papel del laboratorio es fundamental como apoyo en el diagnóstico clínico y, mientras sea mejor el servicio que brinde, el médico buscará más de su soporte para diagnosticar, en este caso, enfermedades reumáticas.

Aunque los AAN se consideran característicos de algunas enfermedades reumáticas, muchas veces se manifiestan en situaciones distintas. El realizar un perfil de AAN ayuda también a identificar estas situaciones.



## VIII. APÉNDICES

### VIII.I Determinación de anticuerpos antinucleares por inmunoperoxidasa indirecta

#### Material

- Portaobjetos con sustrato de células HEp-2
- Medio de montaje
- Tiras de papel filtro
- Micropipetas
- Tubos de ensaye
- Cámara húmeda
- Recipiente para lavar portaobjetos
- Agitador magnético
- Botella de plástico para lavado
- Cubetas 24 x 60mm
- Microscopio de luz

#### Reactivos

- Muestra problema
- Control positivo
- Control negativo
- Conjugante peroxidasa universal
- Amortiguador salino de fosfatos (PBS)

#### Procedimiento.

1. Reconstituir los controles liofilizados y el PBS con agua destilada
2. Preparar la dilución apropiada para el tamizaje del suero
3. Mezclar por inversión

4. Sacar el número necesario de portaobjetos del congelador y dejar que llegue a la temperatura ambiente dentro de la bolsita de estaño (20 minutos)
5. Equilibrar todos los reactivos a temperatura ambiente
6. Sacar los portaobjetos de las bolsas y colocarlos en la cámara húmeda
7. Inmediatamente añadir 25  $\mu$ l de los controles o de los sueros diluidos a los pocillos correspondientes
8. Tapar la cámara húmeda. Incubar los portaobjetos a temperatura ambiente durante 20 minutos
9. Lavar cada portaobjetos suavemente con un chorro de PBS. Aplicarlo sobre los pocillos de forma que el PBS lave sobre cada pocillo, pero sin dañarlos
10. Secar cada portaobjetos y secar el exceso de PBS, alrededor de los pocillos utilizando las tiras de papel filtro. Evitar tocar con las mismas es substrato.
11. Poner los portaobjetos en la cámara húmeda e inmediatamente añadir 1 gota de conjugado de peroxidasa, a cada pocillo
12. Tapar la cámara húmeda. Incubar durante 20 minutos a la temperatura ambiente.
13. Lavar cada portaobjetos suavemente con un chorro de PBS
14. Lavar los portaobjetos durante 10 minutos en un excipiente con PBS. Añadir el agua oxigenada e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
15. Lavar nuevamente con PBS para quitar el exceso de reactivos.
16. Eliminar el exceso de humedad.
17. Utilizar el medio de montaje para cubrir el portaobjetos de manera que se evite la formación de burbujas.
18. Observar en el microscopio de luz a 10X y 40X.

## IX. GLOSARIO

**Antígeno leucocitario humano (HLA):** Se refiere a cualquier complejo de histocompatibilidad humano clase I o II.

**Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) :** Grupo de genes que codifica proteínas de superficie celular y que participan en la presentación de antígeno y constituye uno de los más importantes. Se divide en tres grupos: CMH clase I, CMH clase II, y CMH clase III. A la clase I pertenece cualquiera de las proteínas heterodiméricas de superficie codificadas por el *locus* A, B o C del CMH, que funcionan principalmente en la presentación de antígeno a linfocitos T CD8. A la clase II pertenecen las glucoproteínas heterodiméricas de superficie codificadas por el *locus* DR, DP o DQ del CMH, que funcionan principalmente en la presentación de antígeno a linfocitos T CD4. Y por último, a la clase III pertenecen las proteínas codificadas por un conjunto de genes situados entre los *loci* CMH clase I y II pero que no están relacionados funcional ni evolutivamente con los genes de clase I y II y no desempeñan función alguna en la presentación de antígeno.

**Fenómeno de Raynaud:** El fenómeno de Raynaud es un evento vasoespásmico, trifásico, que puede ser idiopático o estar asociado a enfermedades colágeno-vasculares, principalmente esclerosis sistémica progresiva a quien puede preceder hasta por dos años, se caracteriza por episodios de palidez, cianosis y eritema reflejo, así como hipotermia, afecta regiones acrales y se desencadena habitualmente por el frío, aunque puede presentarse espontáneamente.

**Inmunodifusión radial:** Técnica para cuantificar antígenos con inmunodifusión, en la cual se permite que el antígeno se difunda radialmente en agar que contiene anticuerpos. El anillo de precipitación que se forma como resultado refleja la concentración del antígeno.

**Síndrome de CREST:** Denominación dada a la combinación de calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilidad, y telangiectasia.



## VIII.2 Determinación de especificidad de los anticuerpos antinucleares

### Material

- Placas de inmulon con antígenos pegados contra ADN, SS-A, SS-B, Scl-70, Sm, RNP.
- Pipetas eppendorf calibradas hasta para 100 $\mu$ l
- Puntas para pipeta eppendorf
- Espectrofotómetro para placas

### Reactivos

- Muestras
- Controles positivos
- Control negativo
- Conjugado de peroxidasa universal
- Amortiguador de fosfatos (PBS)

### Procedimiento.

1. Reconstituir controles
2. Preparar la dilución apropiada de las muestras positivas para AAN
3. Aplicar 50 $\mu$ l de muestra en cada uno de los pocitos
4. Incubar a temperatura ambiente por 60 minutos
5. Lavar la placa con solución amortiguadora de fosfatos por dos veces
6. Aplicar anti gamma globulina humana con peroxidasa (100 $\mu$ l).
7. incubar a temperatura ambiente por 30 minutos
8. Agregar 20ml de cromógeno e incubar por diez minutos a temperatura ambiente
9. Poner 10 $\mu$ l de peróxido de hidrógeno.
10. Leer coloración en cada pocito.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Ahearn JM, Provost TT, Dorsch CA, et al. (1982): Interrelationships of HLA-DR, MBB and MT phenotypes, autoantibody expression and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1031-1040.

Arnett FC, Hamilton RG, Roebber MG, et al. (1988): Increased frequencies of Sm and nRNP autoantibodies in American Blacks compared to whites with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatology* 15: 1773-1776.

Balloy Stanley P., Kushner Irving.(1986): *Crithidia luciliae* immunofluorescence test for antibodies to DNA 112: 740-743, Manual of Clinical Laboratory Immunology.

Bambara A, Jessee B (1991). Properties of DNA polymerase  $\delta$  and  $\epsilon$  and their roles in eukaryotic DNA replication. *Biochim. Biophys Acta* 1088, 11-24.

Bernat RL, Borisy GG, Rothfield NF, et al (1990): Injection of anticentromere antibodies in interphase disrupts events required for chromosome movement at mitosis. *J Cell Biol* 11: 1519.

Bernat RL, Delannoy MR, Rothfield NF, et al (1991): Disruption of centromere assembly during interphase inhibits kinetochore morphogenesis and function in mitosis. *J Cell Biol* 66: 1229

Beutner EH. (1972): Defined immunofluorescent staining. *Aan N.Y. Acad Sci*, 254:873-891.

Boey ML, Peebles CL, Tsay G, et al. (1988): Clinical and autoantibody correlations in Orientals with Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Rheum Dis* 47: 918-923.

Brand SR, Bernstein RM, Mathews MB (1994). Autoreactive epitope profiles of the proliferating cell nuclear antigen define two classes of autoantibodies. *J Immunol* 152 4120-28.

Bravo R (1986): Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 163: 287-293.

Bravo R, Frank R, Blundell PA Macdonald-Bravo H (1987): Cyclin/ PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature* 326, 515-517

Burlingame RW, Love WE, Wang B, et al. (1985): Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 angstrom. *Science* 228:546.

Burlingame RW, Rubin RL.(1991): Drug-induced anti-histone autoantibodies display two patterns of reactivity with substructures of chromatin. *J Clin Invest* 88:680.



Buyon JP, Ben-Chetrit E, Karp S, et al. (1989): Acquired congenital heart block: Pattern of maternal antibody response to biochemically defined antigens of the SSA/Ro-SSB/La system in neonatal lupus. *J Clin Invest* 84:627-634.

Cattoglio LJ, Bernstein RM, Black CM, et al (1983): Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlations. *Ann Rheum Dis* 42: 43.

Cooke CA, Bernat RL, Earnshaw WC (1990): CENP-B. A major human centromere protein located beneath the kinetochore. *J Cell Biol* 110: 1475.

Earnshaw WC, Bordwell B, Marino C, et al (1986): Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anticentromere antibodies. *J Clin Invest* 77: 426.

Earnshaw WC, Ratrie H, Stetten G (1989): Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma* 98: 1.

Earnshaw WC, Rothfield NF (1985): Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91: 313.

Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, et al (1987): Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J Cell Biol* 104: 817.

Field M, Williams DG, Charles P, et al (1988): Specificity of anti-Sm antibodies by ELISA for systemic lupus erythematosus: increased sensitivity of detection using purified peptide antigens. *Ann Rheum* 47:820-825.

Frank MB, McArthur R, Harley JB, et al. (1990): Anti-Ro (SSA) autoantibodies are associated with T cell receptor beta genes in systemic lupus erythematosus patients. *J Clin Invest* 85:33-39.

Fritzler MJ, Kinsella TD, Garbutt E (1980): The CREST syndrome: A distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med* 69:520.

Gioud M, Ait Kaci M, Monier J-C (1982): Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. A possible diagnostic tool. *Arthritis Rheum* 25:407.

Gompertz NR, Isenberg DA, Turner BM (1990): Correlation between clinical features of systemic lupus erythematosus and levels of antihistone antibodies of the IgG, IgA, and IgM isotypes. *Ann Rheum Dis* 49:524.

Harley JB, Alexander EL, Bias WB, et al.(1986): Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 29:196-206.



Harley JB, Reichlin M, Arnett FC, et al. (1986): Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjögren's syndrome. *Science* 232:1145-1147.

Hildebrandt S, Weiner ES, Senecal JL, et al. (1990): Autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70): Analysis by Gel diffusion, immunoblot and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopathol* 57:399.

Illei G.G., MD, Klippel JH, MD (1999) Why is the ANA result positive?.

Jarzabek-Chorzelska M, Balscyk M, Jablonska S, et al. (1986): Scl-70 antibody- a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 115:393.

Juarez C, Villa JL, Gelpi C, et al. (1988): Characterization of the antigen reactive with anti-Scl-70 antibodies and its application in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 31:108.

Kallenberg CGM, Pastoor GW, Wouda AA (1982): The TH: Antinuclear antibodies in patients with Raynaud's phenomenon: Clinical significance of anticentromere antibodies. *Ann Rheum Dis* 41:382.

Kephart DC, Hood AF, Provost TT (1981): Neonatal lupus erythematosus: New serologic findings. *J Invest Dermatol* 77:331-333.

Kill IR, Bridger JM, Campbell KHS, Maldonado-Codina G, Hutchinson CJ (1991): The timing of the formation and usage of replicase clusters in S-phase nuclei of human diploid fibroblasts *J Cell Sci* 100: 869-876.

Klinman DM, Steinberg AD. (1987): Systemic autoimmune disease arises from polyclonal B cell activation. *J Exp Med* 165:1755-1760.

Konstantinov K, Russanova V, Russeva V (1986): Antibodies to histones and disease activity in systemic lupus erythematosus: A comparative study with an enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch Dermatol Res* 278:410.

Lee SH, Hurwitz J (1990): Mechanism of elongation of primed DNA by Dna polymerase- $\delta$ , proliferating cell nuclear antigen and activator 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 478-495.

Lerner MK, Steitz JA (1979): Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5495-5499.

Lischwe MA, Ochs RL, Reddy R, et al. (1985): Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr= 34,000, pI8.5) rich in N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup> dimethylarginine. *J Biol Chem* 260:14304.

Masumoto H, Masukata H, Muro Y, et al (1989): A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in aliphoid DNA a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 109: 1963.

Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Jr and Garrels JI (1984): Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309, 374-376.

Mattioli M, Reichlin M (1970): Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. *J Immunol* 107: 1281-1290.

Maul GC, Jimenez SA, Riggs E, et al. (1983) Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: Sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 26:1.

McCarty GA, Valencia DW, Fritzler MJ (1984): *Antinuclear antibodies: contemporary techniques and clinical applications to connective tissue diseases.* Oxford University Press, New York.

Meyer O, Hauptmann G, Tappeiner G, et al (1985): Genetic deficiency of C4, C2, C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro(SS-A) antibodies. *Clin exp immunol* 62:678-684.

Mimori T, Hinterberg M, Petterson I, et al. (1984): Autoantibodies to the U2 small nuclear ribonucleoprotein in a patient with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. *J Biol Chem* 259: 560-565.

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM (1978): Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Biol Chem* 264: 13856-13864.

Molden, DP, Nakamura RM, Tan EM (1984): Standardization of the immunofluorescent test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defines antibody specificity. *Am J Clin Pathol* 82:47-66.

Montzka K, Steitz JA (1991): Additional low-abundance human small nuclear ribonucleoproteins: U11, U12.

Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, et al (1980): Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1627.

Nakamura RM, Peebles CL Molden DP, Tan EM (1984): Advances in laboratory test for autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. *Lab Med* 15: 190-198.

Noel RR, Herman F. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3<sup>rd</sup> edition. ASM, Washington DC. 1986. pp 745-749.



Notman DD, Kurata D, Tan EM (1975). Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Intern Med* 83:464-469.

Okano Y, Medsger TA Jr. (1991): Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 146:535.

Ochs RL, Lischwe MA, Spohn EH, et al. Fibrillarin (1985): A new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell* 54:123.

Palmer DK, O'Day K, Le Trong H, et al (1991): Purification of the centromeric protein CENP-A and demonstration that it is a centromere specific histone. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3734.

Petri M, Watson R, Hochberg MC (1989). Anti-Ro antibodies and neonatal lupus. *Rheum Dis Clin North Am* 15:335-360.

Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus (1992): In *Rheumatic diseases clinics of Northamerica*. Ws Saunders. pp 437-453.

Portanova JP, Arndt RE, Tan EM, et al (1987): Anti-histone antibodies in idiopathic and drug-induced lupus recognize distinct intrahistone regions. *J Immunol* 138:446.

Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B (1987): Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-d auxiliary protein. *Nature* 326, 517-520.

Provost TT, Arnett Fc, Reichlin M (1983): Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus and anti-Ro(SS-A) antibodies. *Arthritis Rheum* 26:1279-1282.

Provost TT, Talal N, Bias W, et al (1988): Ro(SS-A) positive Sjögren's/lupus erythematosus(SC/LE) overlap patients are associated with the HLA-DR3 and/or DRw6 phenotypes. *J Invest Dermatol* 91:369-371.

Provost TT, Talal N, Harley JB, et al (1988): The relationship between anti-Ro(SS-A) antibody positive Sjögren's syndrome and anti-Ro(SS-A) antibody positive lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 124:63-71.

Provost TT, Talal N, Harley JB, et al (1988): The relationship between anti-Ro(SS-A) antibody positive Sjögren's syndrome and anti-Ro(SS-A) antibody positive lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 124:63-71.

Ramsey-Goldman R, Hom D, Deng J-S, et al (1986): Anti-SS-A antibodies and fetal outcome in maternal systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 29:1269-1273.



Reichlin M. (1986): Significance of the Ro antigen system. *J Clin Immunol* 6:339-348.

Reichlin M. Antinuclear antibodies. In Kelley W, Harris E, Ruddy S, et al (eds). *Textbook of Rheumatology*, ed 3. WB Sanders, Philadelphia, 1989, pp 208-225.

Reichlin M, Rader MD, Harley JB (1989): Autoimmune response to the Ro/SSA particle is directed to the human antigen. *Clin Exp Immunol* 76:373-377.

Reichlin M, Reichlin MW (1989): Autoantibodies to the Ro/SS-A particle react preferentially with the human antigen. *J Autoimmunity* 2:359-365.

Reimer G (1990): Autoantibodies against nuclear, nucleolar, and mitochondrial antigens in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 16:169.

Reimer G, Pollard KM, Penning CA, et al (1987): Monoclonal autoantibody from NZB/NZW F1 mouse and some human scleroderma sera target a Mr34,000 nucleolar protein of the U3-ribonucleoprotein particle. *Arthritis Rheum* 30:793.

Reimer G, Scheer U, Tan EM (1988): Immunolocalization of 7-2 ribonucleoprotein in the granular component of the nucleolus. *Exp Cell Res* 176:117.

Reimer G, Steen VD, Penning CA, et al (1988): Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 31:525.

Reveille JD, MacLeod MJ, Whittington K, et al (1991): Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro(SS-A)/La (SS-B) autoantibody responses. *J Immunol* 146:3871-3876.

Rothfield NF, Whitaker D, Bordwell B, et al (1987): Detection of anticentromere antibodies using cloned autoantigen CENP-B. *Arthritis Rheum* 30:1416.

Rubin RL, McNally EM, Nusinow SR, et al (1985): IgG antibodies to the histone complex H2A-H2B characterize procainamide-induced lupus. *Clin Immunol Immunopathol* 36:49.

Rubin RL, Tang F, Chan EKL, et al (1986): IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, sjögren's syndrome, and drug induced autoimmunity. *J Immunol* 137:2528-2534.

Rubin RL, Waga S (1987): Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14(Suppl 13):118.

Scheer U, Rose KM (1984): Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1432.

Sharp GC, Irvin WS, May CM, et al (1976): Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective-tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N Engl J Med* 295: 1149-1154.

Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, et al (1986): High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 231:737.

Shivji MKK, Kenny MK, Wood RD (1992): Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69: 367-374.

St Clair EW, Burch JA Jr, Ward MW, et al (1990): Temporal correlation of antibody responses to different La epitopes of the human La autoantigen. *J Clin Invest* 85:515-521.

St. Clair EW, Query CC, Bentley R, et al (1990): Expression of autoantibodies to recombinant (U1)RNP associated 70K antigen in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 54: 266-280.

Susuka I, Hata S, Matsuoka M, Kosugi S, Hashimoto J (1991): Highly conserved structure of proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein) gene in plants. *Eur J Biochem* 195, 571-575.

Takasaki Y, Fishewild D, Tan EM (1984). Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J. Exp Med* 1; 159(4):981-92.

Tan EM (1989): Antinuclear antibodies. Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44:93.

Tan EM (1982): Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv immunol* 33:167-240.

Tan EM (1996): Pathophysiology of Antinuclear Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and related diseases. *Adv Dent Res* 10(1):44-46.

Tan EM, Kunkel HG (1966): Characteristics of soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 96: 464-471.

Tan EM (1982): Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and Medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240.

Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, et al (1980): Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis: anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum* 23: 617.



Totoritis MC, Tan EM, McNally EM, et al (1988): Association of antibody to histone complex H2A-H2B with symptomatic procainamide-induced lupus. *N Engl J Med* 318:1431.

Weiner ES, Earnshaw WC, Sececal JL, et al (1988): Clinical associations of anti-centromere antibodies and antibodies to topoisomerase I: a study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 31: 378.

Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, et al (1991): Prognostic significance of anticentromere antibodies and antitopoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. *Arthritis Rheum* 34: 68.

Yamagata H, Harley JB, Reichlin M (1984): Molecular properties of the Ro/SSA antigen and ELISA for quantitation of antibody. *J Clin Invest* 74:625-633.