

1991 - A

CODIGO: 083303115

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL ANTIGENO
SS - A (Ro) EN ENFERMEDADES REUMATICAS GENERALIZADAS.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
CRISTINA RODRIGUEZ PATIÑO
GUADALAJARA, JALISCO. 1992

I N D I C E

	PAGINAS
Introducción	1 - 2
Antecedentes	3 - 15
Planteamiento del Problema	16
Hipotesis	17
Objetivos	18
Material y Métodos	19 - 24
Resultados	25 - 31
Discusión	32
Conclusiones	33
Bibliografía	34 - 44

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Mi respecto y agradecimiento.

Por darme la oportunidad de prepararme profesionalmente.

CON AMOR A MI ESPOSO:

M. en C. Juan Manuel Briseño Gálvez, por su apoyo incondicional. GRACIAS

A MIS HERMANOS:

Por su gran apoyo para la realización de mi meta.

A TODOS MIS FAMILIARES:

Especialmente a mis tías la Dra. Luz María Rodríguez Martínez y la Sra. Sara Rodríguez de Fernandez.

AGRADECIMIENTOS

AL DR. IGNACIO GARCIA DE LA TORRE:

Por aceptar ser mi director de tesis y por su valiosa ayuda en la elaboración de la misma. GRACIAS.

AL DR. MARIO SALAZAR:

Por ser asesor de tesis con sus conocimientos como también por su valiosa ayuda.

AL DR. GERARDO OROZCO BAROCIO.

Por su gran colaboración y orientación.

A LOS DRES. GLORIA MARTINEZ BONILLA

Y J. SANTOS DURAN ORTIZ:

Por su asesoría y amistad.

A TODOS MIS AMIGOS.

A MIS MAESTROS ESPECIALMENTE: M en C LUIS A. BURGOS Y M en C. ALFONSO ISLAS.

A TODO EL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA DEL HOSPITAL GENERAL DE OCCIDENTE DE ZOQUIPAN.

Prevalencia de anticuerpos contra el antígeno SS-A (Ro) en enfermedades Reumáticas generalizadas.

INTRODUCCION

Dentro de las pruebas de inmunología que se utilizan en la actualidad para el estudio de los pacientes con enfermedades reumáticas, una de las que más se han desarrollado en años recientes en la prueba investigar la presencia de anticuerpos antinucleares (AAN) en el suero de este grupo de pacientes. Estos anticuerpos representan una de las características serológicas más sobresalientes de las enfermedades reumáticas generalizadas.

Este grupo de enfermedades no es homogéneo en cuanto a sus manifestaciones clínicas, y en su inicio se presentan por lo general con síntomas inespecíficos, como con afectación a diversos órganos de intensidad variable. El lupus eritematoso generalizado (LEG) es el prototipo de estas enfermedades autoinmunes, en las que la mayoría de los órganos son susceptibles de verse afectados.

Otras enfermedades relacionadas dentro de este grupo de padecimientos son;

Lupus Eritematoso Discoide (LED).

Artritis Reumatoide (AR).

Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo (EMTC).

Síndrome de Sjögren (SS).

Escleroderma.

Polimiositis y Dermatomiositis (PM - DM).

Síndrome de Sobreposición.

El antígeno SS - A (Ro) es una ribonucleoproteína intracelular contra la cual se forman anticuerpos que se han encontrado en pacientes con SS_p y LEG. Además se ha observado la separación de las proteínas de SS-A (La) de 48 Kd y SS-A (Ro) de 52 Kd en geles acrilamida y bisacrilamida.

El modelo del antígeno SS-A (Ro) posee dos dominios uno de 37 Kd con una terminación de COOH y otro de 23 Kd que contiene un dominio terminal con una secuencia de 11 - 24 residuos de aminoácidos.

Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) son frecuentes en respuestas autoinmunes en pacientes con :

Lupus Eritematoso Generalizado (LEG)

Síndrome de Sjögren (SS)

Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) se identifican de la siguiente manera: por Inmunodifusión Doble en gel agarosa, por Electroforesis en Acrilamida, y luego la Transferencia en Nitrocelulosa, y Técnica de ELISA.

Los anticuerpos anti-SS-A (Ro) fueron originalmente descritas en sueros de pacientes con Síndrome de Sjogren. Posteriormente en pacientes con Lupus Eritematoso Sistemático donde fueron encontrados autoanticuerpos con la prevalencia de 24.62 % esto en pacientes Mexicanos (68).

La partícula SS -A (Ro) posee diferentes pesos moleculares de 60 Kd, 54 Kd y 52 Kd (72).

ANTECEDENTES

Un dato común en estas enfermedades es una respuesta inmune característica, que se manifiesta con producción de auto-anticuerpos en forma espontánea, que reaccionan con diversas proteínas intra-celulares y con ácidos nucleicos. Una observación que ha sido de gran importancia en la medicina clínica es la demostración de que cada una de estas enfermedades tiene un perfil individual de autoanticuerpos, de tal manera que resulta de utilidad en el diagnóstico diferencial. Por otra parte, en el área de la biología molecular y celular, estos auto-anticuerpos han sido de gran utilidad para conocer la estructura molecular de estas proteínas intra-celulares, y el papel que desempeñan en funciones biológicas de importancia para la célula misma. Las interacciones en esta área del conocimiento, entre la medicina clínica y las ciencias básicas, ha constituido un campo de investigación muy activo en la última década.

Los primeros datos que sugirieron que una reacción antígeno-anticuerpo era una de las características más notables de las enfermedades reumáticas generalizadas fueron sin duda el descubrimiento de la célula LE por Hargraves y colaboradores en 1948, (1) y posteriormente descripción más detallada de este fenómeno por Holman y Kunkel en 1952 (2). Poco antes, en 1950, Coons y colaboradores habrían desarrollado la técnica de inmunofluorescencia indirecta, (3) que fue luego adaptada para demostrar la presencia de anticuerpos circulantes que reaccionaban con diversos sustratos nucleares (4). Así mismo, se encontró también que el suero de pacientes con lupus reaccionaba con nucleohistona que era extraída de timo de ternera (5).

Inicialmente, la aplicación práctica de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de AAN, se utiliza como una ayuda de laboratorio para establecer diagnóstico de lupus (6,7) encontrándose una alta

frecuencia de positividad de esta prueba en el suero de pacientes con lupus, por lo que inicialmente se concluyó que un resultado negativo para AAN prácticamente descartaba la posibilidad del diagnóstico de LEG (8). Desde el final de la década de 1960 y hasta la fecha, se ha hecho evidente que los AAN se presentan en el suero de pacientes con diversas enfermedades reumáticas generalizadas en una proporción muy elevada; este grupo de padecimientos ya se ha mencionado anteriormente (9-10).

El patrón de inmunofluorescencia, que es un dato muy útil, ya que la especificidad del auto-anticuerpo puede inferirse de acuerdo al patrón, y en otros casos identificarse directamente, como ocurre con los anticuerpos anti-centrómero.

Algunos de los ejemplos más comunes de los patrones de inmunofluorescencia que son causados por los diferentes auto-anticuerpos de los pacientes son: la presencia de los patrones homogéneo y / o anular sugiere que el suero del paciente tiene auto-anticuerpos dirigidos contra el ácido desoxirribonucleico de doble cadena (ADNn) o ADN nativo, o bien contra desoxirribonucleoproteína, o contra las proteínas histonas (11,12). El patrón nucleolar se observa cuando los anticuerpos están dirigidos contra proteínas del nucleolo, o bien contra el ARN nucleolar (13-17).

El patrón de AAN moteado fino o granular sugiere la presencia de anticuerpos contra una gran variedad de proteínas nucleares denominadas "no histonas", o bien, contra la matriz nuclear que es un componente relativamente insoluble (12,18-20). En algunos casos puede identificarse directamente la especificidad del anticuerpo anti-centrómero al utilizar células HEp - 2 como sustrato, en las cuales se va observar (en las células de reposo) un patrón de fluorescencia constituido por gránulos

finamente dispersos en todo el núcleo; y en las células en mitosis, la fluorescencia se limita a la región donde están condensados los cromosomas (21).

Otros patrones de fluorescencia que pueden sugerir la especificidad del anticuerpo, son los dirigidos contra la matriz nuclear, (19,20) así también los anticuerpos contra ribonucleoproteína ribosomal (RNP_n), en los cuales vamos a observar fluorescencia casi siempre simultánea de los nucleolos y del citoplasma celular, sitios donde se encuentra este complejo molecular (25).

Actualmente, no hay manera de diferenciar los diferentes antígenos nucleolares en base al patrón de fluorescencia nucleolar (15,27) los cuales varían dependiendo del sustrato utilizado y del método de fijación. En relación con los anticuerpos contra las proteínas nucleares no histonas, algunos autores pueden identificar los anticuerpos anti-Sm, antiribonucleoproteína nuclear (RNP_n), anti-SS-B, y anti-Scl-70, con base únicamente en el patrón de fluorescencia; sin embargo, esto no es seguro, particularmente si el suero contiene varios auto-anticuerpos, ya que a diluciones bajas del suero, un anticuerpo puede consecuentemente darnos otro patrón de fluorescencia (12).

Por esta razón, es importante utilizar otros métodos, como la inmunodifusión doble, para identificar con mayor seguridad la especificidad del anticuerpo (28-29).

En algunos estudios se ha correlacionado el título de anticuerpos anti-Sm, anti- RNP_n y anti-histonas con la actividad de la enfermedad, (30,31) mientras otros investigadores no han encontrado esta asociación (26,32). Estas observaciones diferentes pueden ser debidas a que no hay uniformidad al definir la actividad de la enfermedad, o a los métodos usados para la titulación de la anticuerpos.

El título del anticuerpo obtenido por otros métodos. Un ejemplo de esto son los del anticuerpo anti-SS-B / La y anti-SS-A / Ro. En el caso del anticuerpo anti-SS-B / La puede tenerse un título 1:64 por inmunofluorescencia, sugiriendo niveles bajos del anticuerpo; sin embargo, cuando el mismo suero se estudia por inmunodifusión doble, pueden encontrarse títulos mayores de 1:64. Estas observaciones puede deberse a varios factores: primero, algunos antígenos son extremadamente solubles, y pueden salirse del sustrato durante los procedimientos de lavado al realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (33), segundo, algunos antígenos no conservan su óptima antigenicidad al contacto con algunos fijadores que se utilizan en el método de inmunofluorescencia; y tercero algunos antígenos no se encuentran en la misma concentración en los diferentes sustratos. Un ejemplo de esto lo constituye el antígeno-SS-A (Ro), que no se expresa en la misma concentración en todos los tejidos.

Algunos estudios recientes han mostrado que el antígeno SS-A (Ro) puede encontrarse con relativa abundancia en cerebro fetal y en miocardio (34) mientras que las fuentes tradicionales para obtener el antígeno han sido una línea celular linfoblastoide denominada wil-2, y bazo de diversas especies, incluyendo bazo humano (1,33,35-37).

De hecho cuando se utilizan tejidos de mamíferos como sustrato (hígado o riñón de ratón) los AAn pueden ser negativos si el suero solamente contiene anticuerpos anti-SS-A (Ro) (37).

Este ejemplo del anticuerpo anti-SS-A (Ro) trae a discusión las preguntas acerca del significado de los pacientes con LEG con AAn negativos. Esto ha sido sujeto de controversias, ya que en algunos centros se han informado que hasta un 25% de pacientes con LEG desde el punto de vista serológico son AAn negativos (38-39).

Quizá uno de los aspectos más importantes acerca de este problema está en la selección del sustrato antigénico. Como ya se ha mencionado anteriormente hay una gran variedad de sustratos que pueden utilizarse para la prueba de AAn, y la sensibilidad de cada sustrato dependerá del tejido utilizado, del método de fijación empleado, del tipo de conjugado, así como también del microscopio utilizado, y el error que puede haber entre él o los observadores para interpretación de la prueba. Aun si todos estos factores se logran estandarizar, es posible que algunos sueros de pacientes con LEG continúen siendo negativos. Una de las razones para esta negatividad es que algunos sueros pueden tener anticuerpos dirigidos contra antígenos citoplasmáticos como los son dirigidos contra mitocondrias, lisosomas, ribosomas, filamentos intermedios, aparato mitótico y el aparato de Golgi por nombrar solamente algunos de los que se han descrito. Los antígenos de la superficie de linfocitos, algunas proteínas de la coagulación, o de matriz extracelular (fibrina, colágeno, proteoglicanos, elastina) pueden ser también el blanco de la respuesta autoinmune en las enfermedades reumáticas generalizadas (40-50).

De esta manera, aunque un paciente con LEG o Escleroderma tenga AAn negativo, hay que investigar la presencia de otros auto-anticuerpos que estén dirigidos contra otros antígenos celulares o extracelulares.

Las enfermedades reumáticas generalizadas en ocasiones pueden presentarse con manifestaciones de intensidad leve, y en otras, con síntomas inespecíficos que pueden simular síntomas de enfermedades inflamatorias no reumáticas, o bien de procesos neoplásicos o tóxicos. Por esta razón, la Asociación Americana de Reumatología ha desarrollado una serie de criterios que ayuden a establecer una clasificación correcta de

las enfermedades reumáticas, y la única enfermedad que incluye a los AAN y a la especificidad de los mismos como criterios es el LEG (57).

De los criterios para pacientes con LEG, 2 dependen directamente de la prueba de AAN, y de la definición de la especificidad de los mismos. Una prueba positiva de AAN en un título anormal, y en ausencia de medicamentos que se han asociado con un síndrome parecido al LEG, como son la pocrainanida, hidralazida, y difenilhidantoína un criterio.

En otro criterio puede ser la presencia de células LE positivas, o bien, positividad en la prueba de anticuerpos anti-ADN_n, o la presencia de anticuerpos anti-Sm, o un resultado falso positivo para la prueba de sífilis (VRDL).

Es evidente que hay una gran diversidad de proteínas y de complejos ARN-Proteínas que son el blanco de estos auto-anticuerpos en esta enfermedad. Una de las características serológicas del paciente con lupus es la presencia simultánea de varios anticuerpos, y en estudios previos se ha demostrado que en un paciente con lupus puede haber en promedio tres diferentes anticuerpos anti-ADN_n, anticuerpos anti-histonas y además anticuerpos contra proteínas no histonas tales como el antígeno Sm, o el antígeno U1-RNP_n y otros antígenos que se describen en la Tabla 1. Debido en gran parte a la disponibilidad de estos anticuerpos, ha sido caracterizado se inició con los trabajos de Lerner y Steitz, y los cuales utilizaron ortofosfato marcado con fosforo-32, o metionina marcada con selenio-35, con los cuales marcaron a su vez células que usaron para experimentos de inmunoprecipitación. Con estos experimentos pudieron separar en electroforesis en gel de poliacrilamida, los diferentes ácidos

ribonucleicos pequeños del núcleo (Sn RNA_5), e identificar cuales eran inmunoprecipitados por los anticuerpos de los pacientes con LEG, así como por los anticuerpos de pacientes con otras enfermedades reumáticas (57).

De esta manera se demostró que los sueros con anticuerpos dirigidos contra RNP_n precipitaban solamente la molécula U1-RNA. Por otra parte, los sueros con anticuerpos anti-Sm precipitaban 5 especies de Sn RNA_5 : U1, U2, U4, U5 y U6. En ambos casos, los epítomos que reconocen estos auto-anticuerpos se encuentran en moléculas de proteínas, y no en las moléculas de ARN, las cuales resultan precipitadas por virtud de estar asociadas con las proteínas que son antigénicas en la forma de partículas de snRNP (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas). Mediante estudios de inmuno-transferencia, se ha demostrado también que los anticuerpos anti-Sm reaccionan primeramente con las proteínas B y D, mientras que los anticuerpos anti-U1- RNP_n reaccionan fundamentalmente con las proteínas A y C, según se describe en la Tabla 1.

Debido en gran parte a la disponibilidad de estos autoanticuerpos, ha sido posible elucidar muchos de los eventos relacionados con la unión del precursor de ARN mensajero. Los estudios llevados a cabo en diversos laboratorios han demostrado que los mecanismos de unión son de un proceso complejo en el cual están involucradas varias partículas de Sm RNP, así como otras que no se han caracterizado claramente (57-58).

Estos anticuerpos que se presentan en el LEG y en otras enfermedades autoinmunes reúnen los requisitos de lo que el Dr Robert Good ha denominado Experimentos de la Naturaleza, y a su vez han servido como herramientas para avanzar en nuestros conocimientos de los mecanismos básicos de la biología celular.

De especial interés es la proteína denominada antígeno nuclear de células en proliferación, contra la cual aproximadamente un 3% de los pacientes con LEG forma auto-anticuerpos que son detectables por inmunodifusión doble. Estos anticuerpos han servido para demostrar que el antígeno nuclear de células en proliferación es idéntico a la proteína auxiliar de la ADN polimerasa delta, que está involucrada en la función de replicación del ADN. El anticuerpo ha sido utilizado también para clonar todo el gen que codifica a esta proteína.

En otras enfermedades, como el LEG, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, Síndrome de Sjogren y escleroderma, no se han detectado anticuerpos con estas especificidades. Además de esta característica serológica debe hacerse notar que los anticuerpos anti-ADN_n, anti-Sm,

anti-U1-RNP_n no se detectan en el suero de pacientes con dermatomiositis y polimiositis.

La distribución restringida de ciertos auto-anticuerpos y su relación específica con una enfermedad, es un hecho que se ha evidenciado con los estudios realizados en años recientes. Así por ejemplo de los anticuerpos que se muestran en la Tabla 1, los anticuerpos anti-ADN_n, y los anticuerpos anti-Sm son marcadores específicos de pacientes con LEG, y rara vez se detectan en otras enfermedades autoinmunes; cuando éstos se han detectado, generalmente el paciente tiene manifestaciones clínicas de lupus en asociación con otra enfermedad autoinmune, tales como escleroderma o artritis reumatoide.

Lo mismo se ha observado en pacientes con miositis que tienen anticuerpos anti-U1-RNP_n, o anti-SS-A / Ro, los cuales generalmente se

han detectado en pacientes que tienen datos clínicos asociados de enfermedad mixta del tejido conjuntivo, o LEG, O SS, respectivamente. Así también los anticuerpos anti-PM / Scl y anti-Ku se presentan en pacientes que tienen miosis y síntomas asociados de escleroderma. De los anticuerpos que pudieran denominarse específicos de pacientes con miositis, está el anticuerpo anti-Mi-2 que se asocia con dermatomiositis. Por otra los pacientes que presentan anticuerpos anti-Jo-1 son grupos de pacientes genéticamente restringidos con una incidencia muy elevada de polimiositis, enfermedad pulmonar intersticial, artritis y fenómeno de Raynaud (60); además, generalmente son adultos jóvenes con un comienzo súbito de la enfermedad, y en los cuales en forma característica se ha visto que se presenta en primera mitad del año (61).

Esta presentación estacional contrasta con la dermatomiositis juvenil, que comienza entre junio y enero.

Algunas controversias que han surgido con esta última hipótesis de que la respuesta inmune es este grupo de enfermedades es iniciada por un estímulo antigénico específico, se han originado por las observaciones de que enfermedades como lupus, los antígenos son muy diversos y se localizan en comportamientos diferentes en una misma célula, incluyendo el núcleo (ADN_n, histonas, U1-RNP_n), nucleolo (Ku, RNP ribosomal, SS-B), y citoplasma (SS-A / Ro, RNP ribosomal) (62,64).

Tabla 1 . - Auto-antígenos celulares en Lupus Eritematoso Generalizado.

DESIGNACION	CARACTERISTICAS	ARN ASOCIADO
ADN nativo	ADN doble cadena	Ninguno
ADN Desnaturalizado	ADN de una cadena	Ninguno
Histonas	H1, H2A, H2B, H4	Ninguno
Sm	Proteínas 28KD (B), 29KD (B'), 16KD (D), 13 KD (E)	U1, U2, U4, U5, U6.
RNP NUCLEAR	Proteínas 33 Kd (A) 22 KD (C), 68 / 70 KD	U1
SS-A / Ro	Proteínas 60 KD Proteínas 52 KD	Y ₁ - Y ₅ Humano
SS-B / La	Fosfoproteínas 46 / 48 KD	Pol III transcritos, pre ARN _t , 5S; ARN, VA-ARN, EBER-ARN.
Ku	Proteína 66KD Y 86 KD	Ninguno
RNP ribosomal	Fosfoproteína 38KD, 16KD, y 15 kd.	Ninguno
PCNA / CICLINA	Proteína 36 KD	Ninguno

La elevación en los títulos del anticuerpo anti - SS - A (Ro) provoca la diversificación en la sintomatología de aquellos pacientes con enfermedades reumáticas generalizadas. La partícula anti - SS - A (Ro) es importante detectarla en los sueros de pacientes estudiados en el proyecto que se propone estrayendo la partícula de diferentes extractos para poder facilitar el trabajo a los métodos de identificación de esta misma, ya que es frecuente la asociación vasculitis, LEG, SS_p, AR, Bloqueo cardíaco congénito, MTCD.

En nuestro estado y en la Republica Mexicana hay pocos reportes sobre este anticuerpo anti - SS - A (Ro) en las enfermedades ya mencionadas por lo tanto la presencia de este anticuerpo se presenta según algunos estudios realizados en mestizos que en caucásicos. El modelo fué ya reportada por Mc Cauliffe et al., en Talal, ed. Síndrome de Sogren's, Un modelo para entendimiento Autoinmunidad, ver la Figura No. I. También tenemos estructura del antígeno SS- B (La) Figura No. 2

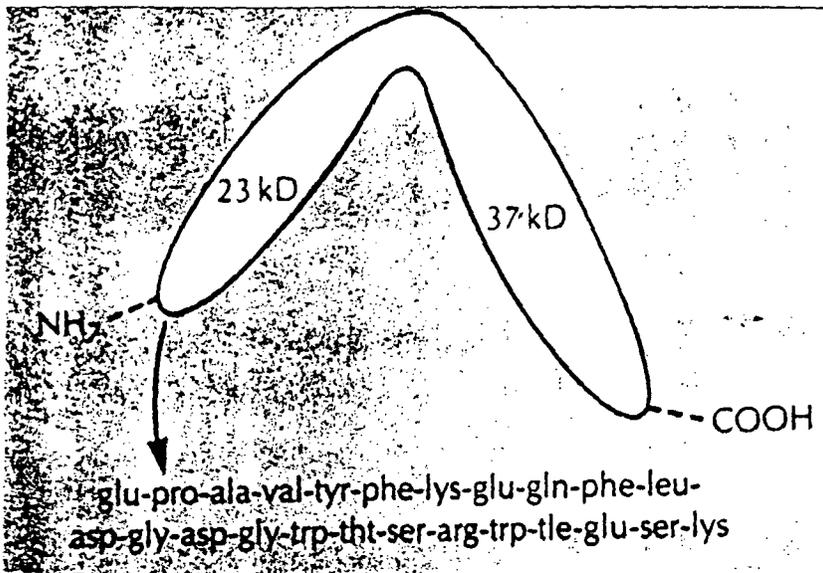


FIGURA No. 1 El modelo del polipeptido SS - A /Ro: Posee dos dominios al dominio de 23 - Kd contiene en oposición un amino terminal con una secuencia de 11 - 24 residuos de aminoácidos y el dominio 37 Kd posee un grupo COOH terminal. (Por McCauliffe et al., en Talal, ed. Síndrome de Síndrome de Sjogren's, Un modelo para entendimiento Autoinmunidad. Academic Press, 1989, pp 67 - 73 ; con permiso).

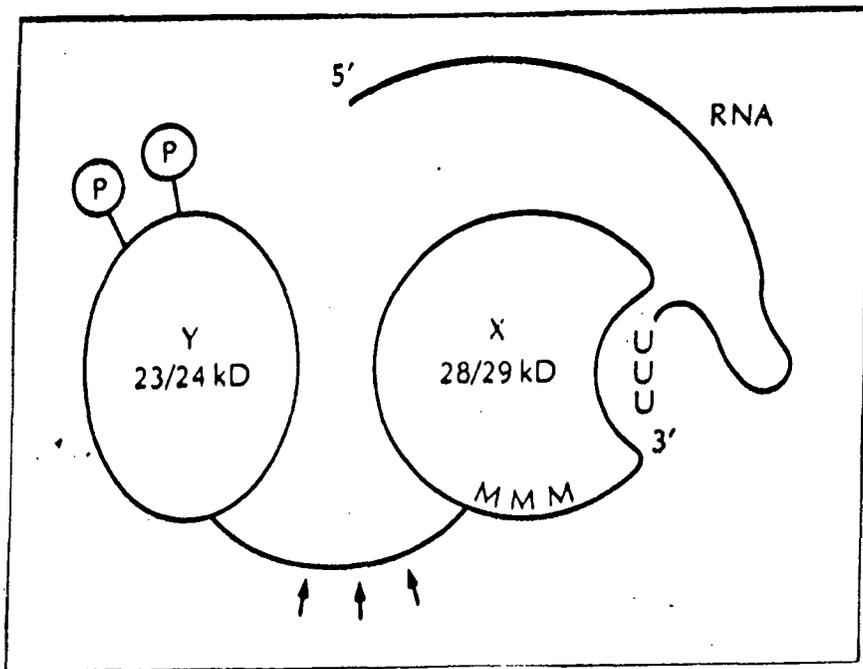


FIGURA No. 2 Modelo estructural de SS - B / La: Este diagrama SS - B / La posee 2 - Dominios de ribonucleoproteína con un largo dominio X de 28/29 Kd que esta unida a un RNA pequeño con 3 - oliuridilato por 3'. La metionina (M) son residuos restringidos unidos en el dominio X contra el dominio Y de 23 24 Kd el cual posee residuos de ácidos fosforilados (P). (Por Chan et al., en Talal, ed. Síndrome de Sjogren, Un modelo para entendimiento de autoinmunidad. Academic Press, 1989, pp 13 - 19 ; con permiso).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Investigar los anticuerpos anti-SSA (RO) descrito en las enfermedades reumáticas utilizando como sustrato antigenico el extracto soluble, de bazo bovino y cerdo por el metodo de Inmunodifusión Doble. La técnica de ELISA tambien se realizara por su mayor sensibilidad.

La importancia de este trabajo es observar la prevalencia de estos anticuerpos dentro de este grupo de enfermedades ya mencionadas.

H I P O T E S I S

Sí el anticuerpo anti -SS-A (Ro) se presenta en el suero de pacientes con enfermedades reumáticas generalizadas que se manifiestan por lo general con síntomas inespecíficos y con afectación a diversos órganos de intensidad variable, es importante investigar la detección de estos anticuerpos en este grupo de padecimientos.

O B J E T I V O S

- 1.- Observar la frecuencia del anticuerpo anti-SS-A (Ro) en pacientes con enfermedades Reumáticas Generalizadas.
- 2.- Aplicar diferentes técnicas inmunológicas (Inmunodifusión Doble y ELISA) en su detección.
- 3.- Implementar la técnica de Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunotransferencia subsecuente.
- 4.- Aplicar el método estadístico para el significado de la prueba.

M A T E R I A L Y M E T O D O

Se obtendrá el extracto de bazo bovino y de cerdo fresco de la autopsia de los correspondientes animales del rastro de Zapopan Jal. Tomando en cuenta que el animal este sano ;el bazo será procesado de acuerdo con el siguiente método establecido donde se obtendrá parcialmente el antígeno SS - A (RO).

PREPARACION DEL ANTIGENO:

La purificación antígeno SS - A (RO) obtenido por la autopsia de bazos de cerdo y bovino preparado con el método de Clark, con modificaciones. El proceso de la preparación esta formada por un buffer a 4⁰C suspendido con 0.02 % NaN_3 , 1.5 mM ditiotreitól, y 1 mM fenilmetilsulfonil Fluoruro. El bazo se homogenizo en 4 volúmenes de 50 mM NaCl Buffer A, se centrifugo por 45 minutos a 15 000 g. El sobrenadante se mezcla por 1 hora con dietilaminoetil celulosa (DE 52) 500 mg. por cada gm de bazo equilibrando en Buffer A.

La proteína se lavo con 50 mM tris Cl (pH 7.4), 300 mM CaCl, dializandolo a 50 mM acetato de Amonio, pH 7.0 y se refrigera. Despues se dializara el extrato de bazo apropiada para pruebas de antígenos en inmunodifusión Doble.

INMUNODIFUSION DOBLE EN GEL AGAROSA:

El anticuerpo anti SS-A (Ro) se detecta con inmunodifusión doble en un de gel agarosa al 0.4 % donde 40 mg. de agarosa se afora a 100 ml de Buffer de PO_4 y EDTA con ázida de sodio. Se vaciara a un vaso de precipitado Pyrex poner el agitador magnético hasta ebullición.

Se tomara 6 ml en pipeta de vidrio y vaciar en cada uno de los platillos de petri, donde se realizara la inmunoespecificidad este método se utilizara para determinación de anticuerpos precipitantes. Esta caja de

petri con agarosa tendra 7 orificios y se pondra .100 ml de suero a probar contra un extracto de bazo de bovino y cerdo ya obtenido anteriormente.

Los sueros que se utilizaran para realizar estas pruebas son los siguientes: 20 sueros de Sindrome de Sjogren, 40 sueros de Lupus Eritematoso. Los sueros seran obtenidos de pacientes del Departamento de inmunologia y Reumatologia del Hospital General de Occidente de S.S. Guadalajara, Jal.

Técnica de ELISA representada por la figura No. III.

Posteriormente se utilizo la técnica de ELISA que es más sensible (de DIAMEDIX, CORP., MIAMI FL EUA). para obtención de el antígeno SS - A (Ro)

metodo es el siguiente:

- 1.- Tomar 5 microlitros de muestra para 500 microlitros (o 2 microlitros para 200 microlitros) de muestra diluida. Mezclar bien.
- 2.- Colocar 100 microlitros de muestra diluida en pozo del antígeno.
Conservar un pozo para reactivo blanco (100 microlitros de muestra diluida).
- 3.- Incubar a temperatura ambiente por 30 ± 5 minutos.
- 4.- Destilar .Lavar los pozos tres veces con solución de lavado y estilar.
- 5.- Colocar dos gotas (o 100 microlitros) de conjugado.
- 6.- Incubar a temperatura ambiente 30 ± 5 minutos.
- 7.- Destilar. Lavar los pozos tres veces con solución lavadora y estilar.
- 8.- Colocar dos gotas (O 100 microlitros) de sustrato en pozos.
- 9.- Incubar a temperatura ambiente por 15 ± 2 minutos.
- 10.- Colocar dos gotas (o 100 microlitros) de solución stop en pozos.

11.- Leer la absorbancia a 405 nanómetros contra el reactivo blanco.

Microensayo anti - SSA:

96 - Prueba fabricada

192 - Prueba fabricada

Este método se utiliza para la detección y cuantificación de anticuerpos contra el antígeno SS -A (Ro) en suero como auxiliar en el diagnóstico ,pronóstico y monitoriar de ciertas enfermedades Reumáticas autoinmunes. La microensayo DIAMEDIX Anti-SS-A es un método micro ELISA el cual es usado par cuantificación de anticuerpos SS - A.

Los resultados son reportados en unidades de ELISA (EU) por ml, normalizados por comparación con un calibrador. Los valores cuantitativos son obtenidos con una unica muestra diluida.

Proceso de Electroforesis en gel poliacrilamida.

Los dos platos de vidrio barras espaciadoras de plástico. Se cubren con vaselina. Checar que no haya goteras.

Gel de Separación.

1.- Producir 20 ml. de gel de separación, y emitir 17.5 ml. con pipeta.

2.- Suavemente sobre la capa ,rebajar con buffer usando una pipeta (1 ml. rebajar el gel + 3 ml D.W.).

3.- Secar.

Gel de Apilamiento.

1.- Producir 10ml. del gel de apilamiento. Lavar cubriendo el gel de separación con pipeta.

2.- Cambiar 2 top y colocar poco a poco el peine. En el gel de apilamiento cuidadosamente para evitar cualquier burbuja de aire bajo los dientes del peine. Llenar hasta el tope. Toma aproximadamente 1 hora para polimerizar.

Remover el peine cuidadosamente.

Remover el boton de las grapas.

Limpiar el exceso de vaselina del fondo del plato de vidrio.

Colocar la plancha en el aparato y asegurarlo.

Poner la plancha con gel a 15 MAMP por 1 hora, antes de aplicar la muestra. EL electrodo negro arriba y el rojo abajo.

La solusion Stock:

1. - Tris - HCL - SDS pH 8.8 - Gel de Separación 4X (Gel de resolución)

Tris 18.17 g (1.5 M)

HCL DE pH 8.8

SDS 4 ml 10 % (0.4 %)

Ajustar al final a un volumen 100 ml.

2. - Tris - HCL - SDS pH 6.8 Gel de Apilamiento 4X (Stacking gel)

Tris 6.06 g (0.5 M)

HCL de pH 6.8

SDS 4 ml 10 % (0.4 %)

Ajustar al final a un volumen de 100 ml.

3. - Acrilamida y Bis Reactivo C

Acrilamida reacrystalizada 30 gr. (30%)

Bis

Disolver acrilamida en - 50 ml dH₂O y de BIS.

Ajustar a un volumen de 100 ml. Filtrar.

4. - Buffer Electrodo.

Tris 3.03 gr (0.025 usa base Trizma)

Glicina 14.41 gr (0.192 M) y 900 ml de agua.

Ajustar pH de 8.3 ± 0.1 con Na OH

Y 10 ml de SDS 10% (0.1 % condicion final) y de agua 1 litro.

El gel de separación y apilamiento se realiza de la siguiente manera:

Gel de separación (30 ml) 12.5%		Gel de apilamiento
4x Buffer de separación	7.5 ml.	2.5 ml
Reactivo C	10.0 ml.	1 ml
Agua	12.5 ml.	6.5 ml
TEMED	7.5 Landas o 75 microlitros.	10 landas
Persulfato de Amonio 10% (fresco)		.030 microlitros.

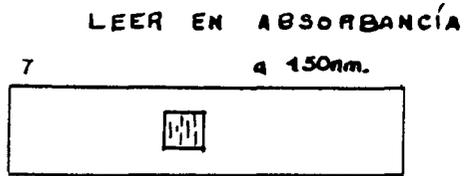
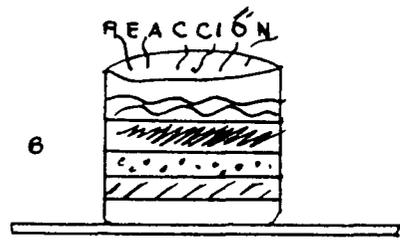
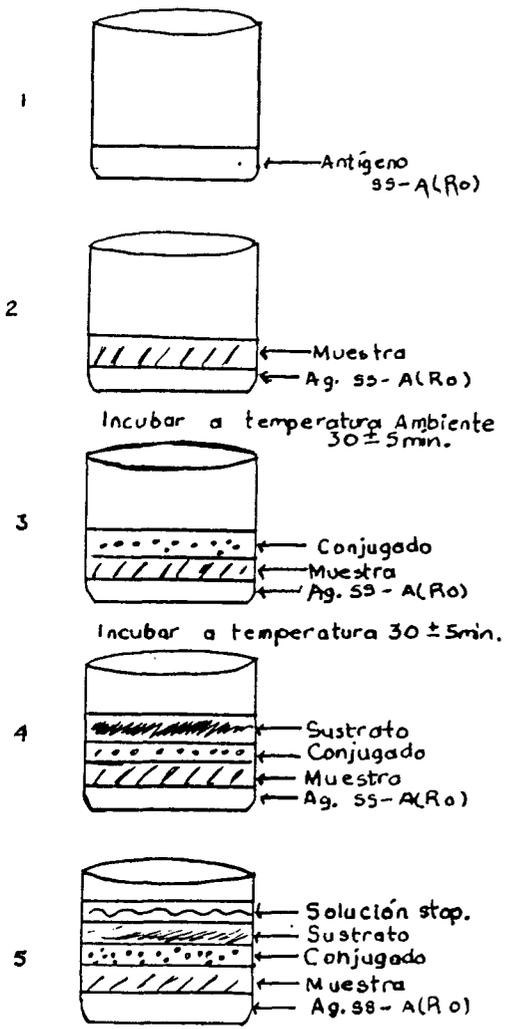
140 Landas

Despues del corrimiento se prosede a una tinción con azul de Coomassie, por 10 a 15 minutos, y posteriormente se pasa a una solución destiñidora formada por:

10 % Alcohol Isopropil	20 ml
10 % Acido acetico	20 ml
Agua bidesilada	160 ml

POR TODA LA NOCHE.

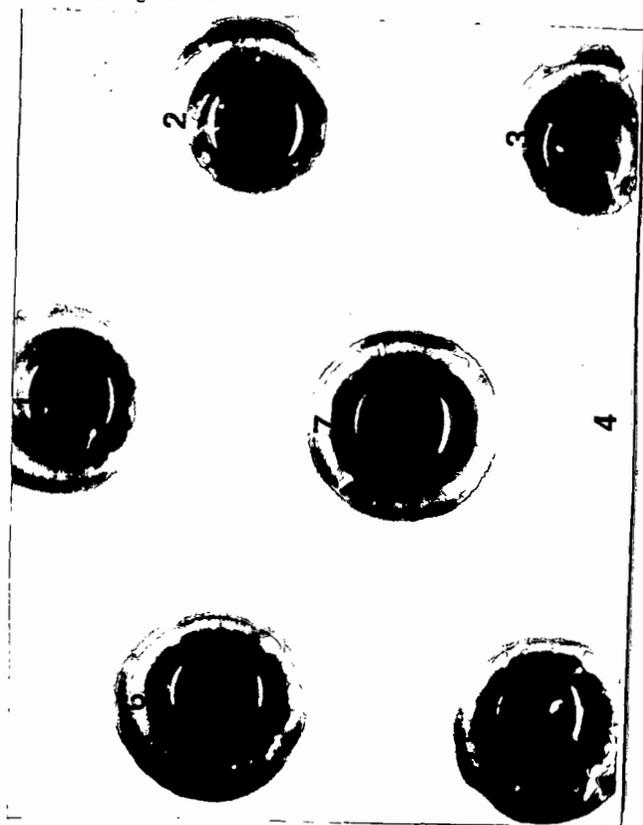
Figura No. III. La técnica de ELISA.



RESULTADOS

Los anticuerpos de anti-SS - A / Ro que se reportan en pacientes con las enfermedades Reumaticas Generalizadas. El antígeno SS - A / Ro no fue detectado por la técnica de inmunodifusión Doble en los sueros de pacientes ya propuestos por la poca sensibilidad que hay en esta técnica. El extracto de bazo cerdo y de bovino no hubo precipitación de líneas. El extracto posee antígeno SS - A (Ro) puede ser destruido con facilidad por algunas enzimas como también por el proceso del método.

Fotografía No.1



INMUNODIFUSION DOBLE

- 1.- Caso # 1
- 2.- Caso # 2
- 3.- Caso # 3
- 4.- Caso # 4
- 5.- Caso # 5
- 6.- Caso # 6
- 7.- Extracto de Bazo Bovino.

Los sueros pacientes estudiados en total fueron 60 :40 Lupus Eritematoso Generalizado, 20 Síndrome de Sjögren primario.

En la técnica de ELISA (Análisis Enzimático - acoplado a inmunoabsorbente), se obtuvieron los siguientes resultados. La frecuencia del antígeno SS - A (Ro) en enfermedades Reumáticas Generalizadas en Unidades de ELISA por ml. (EU / ml). Es representada por la Grafica No 1

GRAFICA No.1 FRECUENCIA DEL ANTICUERPO SS - A (Ro) EN ENFERMEDADES REUMATICAS GENERALIZADAS EN UNIDADES DE ELISA POR ml. (EU / ml).

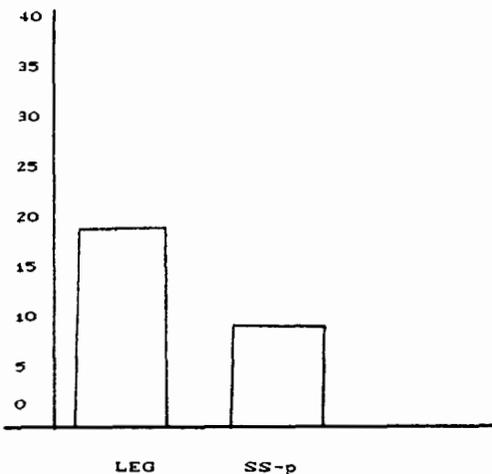


TABLA No. 2. FRECUENCIA DE ANTICUERPOS SS - A / Ro. EN UNIDADES DE ELISA. EN PACIENTES CON ENFERMEDADES REUMATICAS GENERALIZADAS.

	LEG	SS - p	CONTROLES SANOS
TOTAL n=	40	20	10
POSITIVOS	18	8	0
NEGATIVOS	22	12	10

Los resultados se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{EU / ml del calibrador}}{\text{Absorbancia del calibrador}} \times \text{Absorbancia del problema} = \frac{\text{EU/ml del problema}}{\text{Absorbancia del problema}}$$

Los resultados de los sueros de los pacientes:

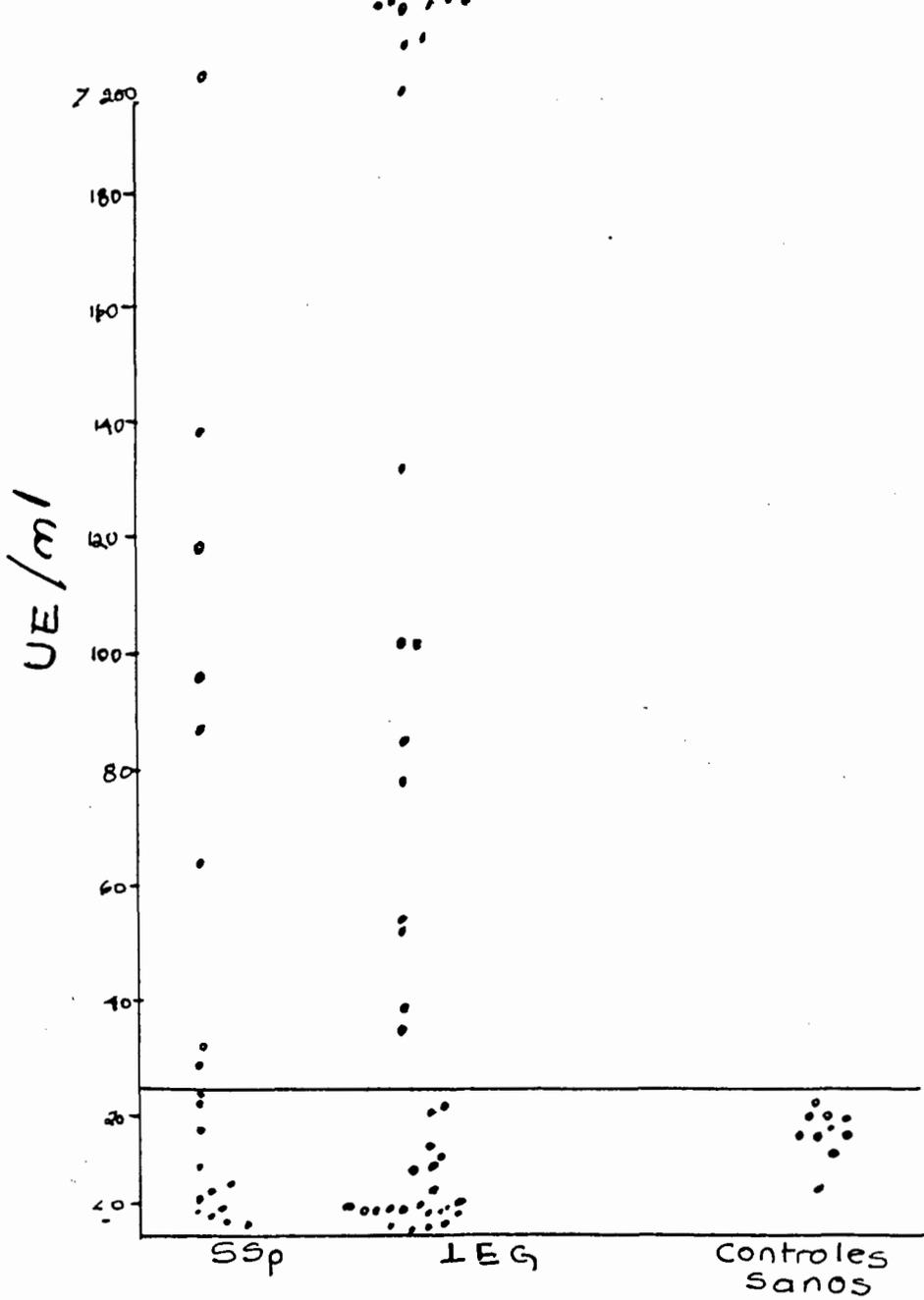
- > 25 UE / ml son positivos
- 15 - 25 UE / ml son equivococ
- < 15 UE / ml son negativos.

No.	EU / ml
Blanco	0
Calibrador	-120.0
Control +	- 79.9
Control -	-10.5

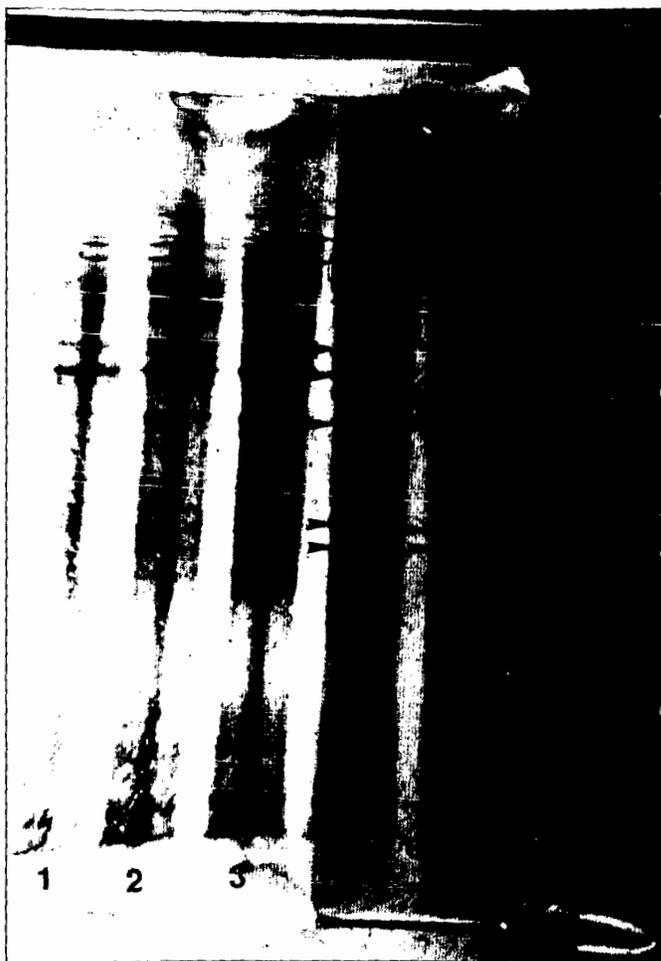
Los resultados son representados por grafica No. 2

En el corrimiento del gel de poliacrilamida se observan bien las bandas por lo tanto la implementación de la técnica de Electroferesis resulto. Se realizo esta implementación con el motivo de poder detectar los pesos moleculares de el antígeno SS - A (Ro) y probar la efectividad del extracto de bazo cerdo y bovino.

En las fotografias No. 2 Se observa el gel poliacrilamida al 12.5 % y las fotografias No. 3, 5 se representan pacientes uno con SS y LES.



Grafica No.2 Distribución de la Población.



En la Fotografía No. 2. SE OBSERVA EL GEL POLIACRILAMIDA AL 12.5 % DONDE LAS BANDAS 4,5,6 MUESTRAN LOS DIFERENTES PESOS MOLECULARES. LA LINEA 4 REPRESENTA AL EXTRACTO DE BAZO CERDO Y LAS LINEAS 5 ,6 REPRESENTAN EL EXTRACTO DE BAZO BOVINO ESTAS LINEAS PRESENTAN LINEAS DE 66 KD,60 KD,52 KD,48 KD,45 KD,36 KD,29 KD,24 KD QUE SON INDICADAS POR FLECHAS.



La Fotografia No. 3. REPRESENTA A UN PACIENTE CON LUPUS ERITEMATOSO
SISTEMATICO.



La Fotografia No. 4 . REPRESENTA A UN PACIENTE CON SINDROME DE SJOOREN.

DISCUSION

Tratando de definir la frecuencia de los anticuerpos anti-SS-A (Ro), se han reportado resultados diferentes. Se han propuesto varias explicaciones para tales discrepancias: primero los métodos para detectar anticuerpos anti-SS-A (Ro) en reportes publicados varían ampliamente en cuanto a la sensibilidad de las pruebas para detectar estos anticuerpos ya que han incluido diferentes métodos como: inmunodifusión doble, ELISA e inmunoblots.

Segundo, la especificidad quizá también varían de un estudio a otro, algunos autores dicen que la técnica de inmunoblots es más sensible que la inmunodifusión doble usando el mismo extracto (67).

La diferencia podría ser explicada por una base genética porque hay reportes asociados con muchos antígenos HLA, particularmente DR3, HLA, DR2 y HLA - DR 7 con la presencia de anticuerpos anti-SS-A (Ro) esto en pacientes con LEG. En Síndrome de Sjögren primario tiene la presencia de antígenos HLA - DR 3 (68,70).

En artritis reumatoide, contiene anticuerpos Ro con presencia de La (69). Elaine L. Alexander, reporta de 75 pacientes 33 se encontraron anticuerpos anti-SS-A (Ro) siendo el porcentaje el (44 %) estos asociados con vasculitis, esclerosis, AR, LEG (70).

En otros reportes por la técnica de inmunodifusión doble fué positiva hubo precipitación la de SS-A (Ro) usando el extracto de timo humano y extracto de bazo humano (71).

Basados en nuestros resultados el anticuerpo SS-A (Ro) no fué detectado por inmunodifusión doble debido a la poca sensibilidad y la desnaturalización durante el proceso de los extractos utilizados en pacientes con enfermedades reumáticas generalizadas. En la técnica de ELISA el anticuerpo SS-A (Ro) fué más sensible en su detección de esta misma en 60 pacientes el 40 % es para Síndrome de Sjögren y 45 % para Lupus Eritematoso Generalizado, más baja que la reportada por otros autores.

Basados en nuestros resultados creemos que el anticuerpo anti-SS-A (Ro) no es específico para LEG, SS-p ya que pueden estar presentes en las diversas enfermedades reumáticas generalizadas.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Investigamos la frecuencia de anticuerpos anti - SS - A (Ro) no detectado por Inmunodifusion Doble debido a la poca sensibilidad de la técnica, por la técnica de ELISA se observo algún porcentaje de sueros positivo debido a la alta sensibilidad de esta misma, en pacientes con varias Enfermedades Reumaticas Generalizadas (E.R.G.).
- 2.- En nuestro grupo de pacientes La frecuencia fué de 40 % en Síndrome de Sjögren en el grupo con Lupus Eritematoso Generalizado fué 45 % más baja que la reportada por otros autores.
- 3.- La diferencia puede ser explicada por una base genética, por que hay informes asociados a muchos antígenos pero con la presencia de anti -SS- A (Ro).
- 4.- En resumen la frecuencia del anticuerpo SS - A (Ro) en nuestro grupo de pacientes con LEG, SS-_p, fue ligeramente más bajo que en los reportados previamente . Desde nuestro punto de vista la presencia de este anticuerpo no es diagnóstico y no puede ser utilizado como marcador de anticuerpos de algún factor clínico en LEG, SS-_p.

B I B L I O G R A F I A

1. - Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicines. *Advances immunol.* 33 :167 1982.
2. - Hargraves MM, Richmond H, and Morton R: Presentation of two bone marrow elemens: The "tart" cell and the "LE" cell, *Mayo Clin Proc.* 23:25, 1948.
3. - Holman HR, and Kunkel HG: Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein, *Science* 126:162, 1957.
4. - Coons AH, and Kaplan MH: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescet antibody. *J Exp Med* 91:1 1950.
5. - Haserick JR, Lewis LA, and Bortz DW: Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus. I. Determination of gamma globulin as specific plasma fraction. *Am J Med Sci* 219:660. 1950.
6. - Friou GJ, and Quismorio FP: The LE cell factor and antinuclear antibodies. In Cohen AS (Ed), *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases* (2nd ed.) Boston: Little Brown, 1975, p. 159.
7. - Scopelitis E., Biundo JJ, Alspaugh MA; Anti-SS-A antibody and other antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 23:287-293, 1980.
8. - Kunkel HG, and Tan EM: Autoantibodies and disease. *Adv. Immunol.* 4:351, 1984.

9. - Beck JS: Antinuclear antibodies; Methods of detection and significance. *Mayo Clin Proc*, 44: 600, 1969.

10. - Fernández-Madrid F, Mattioli M: Antinuclear antibodies (ANA): Immunologic and clinical significance. *Semin. Arthritis Rheum* 6: 83, 1976.

11. - Tan EM, Fritzler MJ, and Reyes-López PA: Autoantibodies as biological markers. In Rudson RW (Ed.), *Biologicals Markers*. In Rudson RW (Ed.), *Biologicals Markers of Neoplasia: Basic and Aspects*. New York: Elsevier-North Holland, 1978, p. 399.

12. - Notman DD, Kurata N, and Tan EM: Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Int Med* 83: 464, 1975.

13. - Casals SP, Friou GJ, and Teague PO: Specific nuclear reaction pattern of antibody to DNA in lupus erythematosus sera. *J Lab Clin Med* 62: 625, 1963.

14. - Lachman PJ, and Kunkel HG: Correlation of antinuclear antibodies and nuclear staining patterns. *Lancet* 2: 436, 1971.

15. - Reddy R, Tan EM, Henning D, Nohfa K, and Busch H: Detection of nucleolar 7-2 ribonucleoprotein and a cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from patients with scleroderma. *J Biol Chem* 258: 1383, 1983.

16. - Pinnaas JL, Northway JD, and Tan EM: Antinucleolar antibodies in human sera. *J Immunol* 111:996, 1974.
17. - Rodríguez-Sánchez JL, Gelpi C, Rodríguez-de la Serna A, Juárez C, and Díaz-López C: Antibodies to chromosomal satellites: A new autoantibody specificity. *Arthritis Rheum (abstr)* 27:544, 1984.
18. - Northway JD, AND Tan EM: Differentiation of grouping speck patterns in immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopath* 1:140, 1972.
19. - Tan EM: Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 70:800, 1967.
20. - Salden MHL, Van Eekelen CAG, Habets WJA, Vierwinden G, Van de Putte I. BA, and Van Verooij WJ: Antinuclear matrix antibodies in mixed connective tissue disease. *Eur J Immunol* 12:783, 1982.
21. - Fritzler MJ, Ali R, and Tan EM: Antibodies from patients with mixed connective tissue disease react with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein or ribonucleic acid (hn RNP / RNA) of the nuclear matrix. *J Immunol* 132:1216, 1984.
22. - Moroi Y, Peebles C, Fritzler JM, Steigerwald JC, and Tan EM: Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc, Natl Acad Sci* 77:1627, 1980.

- 23.- Miyachi K, Fritzler MJ, and Tan EM: Autoantibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121:228, 1978.
- 24.- Takasaki Y, Deng JS, and Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: its distribution in synchronized cells, *J eExp Med* 15:1899, 1981.
- 25.- Francoeur AM, Peebles CL, Heckman KJ, et al: Identification of ribosomal protein autoantigens, *J Immunol* 135:2378, 1985.
- 26.- McCarty GA, Rice JR, and Dedrich NM: Peripheral pattern of antinuclear antibody staining in patients with systemic lupus erythematosus: Lack of correlation with simultaneous presence of anti-DNA antibodies. *Lab Invest* 40:35, 1979.
- 27.- Ritchie RF: Anti-nucleolar antibodies: Their frequency and diagnostic application, *N Engl J Med* 282:1174, 1970.
- 28.- Tan EM, Northway JD, and Pinnas JL: The clinical significance of antinuclear antibodies, *Postgrad Med* 54:143, 1973.
- 29.- Winfield JB, Faiferman F, and Koffer D: Avidity of anti-DNA antibodies in sereum and Ig Gomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus with or without nephritis and in other connective tissue diseases. *J Clin Invest* 59:90, 1977.

30. - Sharp GC, Irvin WS, LaRoque RL, Velez C, Daly V, Kaiser AD, and Holman HR: Association of autoantibodies to different nuclear antigens with clinical patterns of rheumatic disease and responsiveness to therapy. *J Clin Invest* 50:350, 1971.
31. - Gioud M, Aitkaci M, and Monier JC: Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:407, 1982.
32. - Fritzler MJ, Ryan JP, and Kinsella TD: Clinical features of systemic lupus erythematosus patients with antihistone antibodies. *J Rheumatol* 9:46, 1982.
33. - Harmon CE, Deng J-S, Peebles CL, and Tan EM: The importance of tissue substrate in the SS-A / Ro antigen- antibody system. *Arthritis Rheum* 27:166, 1984.
34. - Wolin SL, and Steitz JA: The Ro small cytoplasmic ribonucleoprotein particles: structures and clues to the pathogenesis of congenital heart block. *Clin Res (abstr.)* 32:470, 1984.
35. - Clark G, Reichlin M, and Tomasi TB: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 102:117, 1968.
36. - Sontheimer RD, Maddison PJ, Reichlin M, Jordon RE, Stastny P, and Gilliam JN: Serological and associations in subacute cutaneous lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 97:664, 1982.

- 37.- Maddison PJ, Provost TT, and Reichlin M: Serologic findings in patients with ANA negative systemic lupus erythematosus. *Medicine* 60:87, 1981.
- 38.- Fessel WJ: ANA - negative systemic lupus erythematosus *Am J Med* 64:80, 1978.
- 39.- Gladman DD, Chalmers A, and Urowitz MB: Systemic lupus erythematosus with negative LE cells and antinuclear factor. *J Rheumatol* 5:142, 1978.
- 40.- Deicher HRG, Holman HR, and Kunkel HG: Anticytoplasmic factors in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and certain other diseases. *Arthritis Rheum* 3:1, 1960.
- 41.- Provost TT, Ahmed AR, Maddison PJ, and Reichlin M: Antibodies to cytoplasmic antigens in LE (serologic marker for systemic disease). *Arthritis Rheum* 22:858, 1979.
- 42.- Tesser JRP, Rothberger H, and Agudelo C: The clinical significance of anticytoplasmic antibodies found on fluorescent antinuclear antibody testing. *J Rheumatol* 10:227, 1983.
- 43.- Doniach D, Roitt IM, Walker JG, and Sherlock S: Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis other liver diseases and their clinical implications. *Clin Exp Immunol* 1:234, 1966.

44. - Bell DA, Thiem PA, Vaughan JH, and Laddy JP: Studies with human leukocyte lysosomes. Evidence for antilyosome antibodies in lupus erythematosus and for the presence of lysosomal antigen in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 55:256, 1975.
45. - Sturgill BC, and Carpenter BR: Antibody to ribosomes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 8:213, 1965.
46. - Schur PH, Moroz LE, and Kunkel HG: Precipitating antibodies to ribosomes in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Immunochem* 4:447, 1967.
47. - Miyachi K, and Tan EM: Antibodies reacting with ribosomal ribonucleoprotein in connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 22:87, 1979.
48. - Meroni PL, DeBartolo G, Barcelline W, Riboldi PS, Basile R, Batterle C, and Zanussi C: Anti-ribosomal ribonucleoprotein autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 4:45, 1984.
49. - Osung OA, Chandra M, and Holborow EJ: Antibody to intermediate filaments of the cytoskeleton in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 41:69, 1982.
50. - Senecal JL, Rothfield NF, and Aliver JM: Immunoglobulin M autoantibody to vimentin intermediate filaments. *J Clin Invest* 69:716, 1982.

51. - McCarty GA, Valencia DW, and Fritzler MJ: Antibody to the mitotic spindle apparatus: Immunologic characteristics and cytological studies. *J Rheumatol* 11:213, 1984.
52. - Fritzler MJ, Etherington J, Sokoluc C, Kinsella TD, and Valencia DW: Antibodies from patients with autoimmune disease react with a cytoplasmic antigen in the Golgi apparatus. *J Immunol* 132:2904, 1984.
53. - Okudaira K, Searles RP, Goodwin JS, and Williams RC Jr: Antibodies in the sera of patients with systemic lupus erythematosus that block the binding of monoclonal anti- λ to λ positive targets also inhibit the autologous mixed lymphocyte response. *J Immunol* 129:582, 1982.
54. - Castro O, Farber LR, and Clyne LP: Systemic lupus erythematosus, *Ann Intern Med* 77:543, 1972.
55. - Boxer M, Ellman L, and Carvallo A: The lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 19:1244, 1976.
56. - Rosenberg AM, Hunt DW, and Petty RE: Antibodies to native type I collagen in childhood rheumatic diseases. *J Rheumatol* 11:421, 1984.
57. - Tan EM, Cohen AS, Fries J, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271, 1982.

58. - Lerner MR, Stitz JA: Snurps and Scyrps, cell 25:298, 1981.
59. - Brunel C, Sri-Widada J, Jeanteur P: snRNP_s and scrNP_s in eukaryotic cells. *Progr Mol Subcell Biol* 9:1, 1985.
60. - Bernstein RM, Mathews MB: Jo-1 and other myositis autoantibodies. In: Brooks PM, Your JR, eds. *Rheumatology-85. Excerpta Medical International Congress Serie No. 675. New Your: Elsevier Science Publishing Co. Inc. 1985, pag. 273.*
61. - Leff RL, Burgess SH, Miller FW, Love LA, Plotz PH: Epidemiology of adult idiopathic inflammatory myopathy: A distinct clinical onset in patients with anti-Jo-1 antibodies. *Arthritis Rheum* 31:S 1231 (Suppl), 1988.
62. - Miller FW, Biswas T, Twitty SA, Plotz PH: Anti-Jo-1 antibodies are isotype restricted and their levels correarate with myositis disease activity. *Arthritis Rheum* 31:S81 (Suppl), 1999.
63. - Mathews MB, Reichlin M, Hughes GR, Bernstein RM: Anti-threonyl-_tRNA synthetase, a second myositis-related autoantibody. *J Exp Med* 160:420, 1984.
64. - Bunn CC, Bernstein RM, Mathews MB: Autoantibodies against alanyl-_tRNA synthetase and synthetase and _tRNA Ala coexist and are associated with myositis. *J Exp Med* 163:1281, 1986.

65.- Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, y cols: Antibodies to topoisomerasa I are found in sera from scleroderma patients. *science* 231:737,1986.

66.- Rierre Youinou, MD, PhD, Haralampos M. Moutsopoulos, MD, FACP, and Yvon L. Penneç, MD. Clinical features of Sjogren's syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*, 2:687-693,1990.

67.- Gilles Boire, Francisco-Javier Lopez-Longo, Sylvie Lapointe, and Henri-A. Ménard: Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60 - Kd Ro / SS - A protein. *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 34, 6:722 - 730,1991.

68.- Ignacio G.-De la Torre, Sergio A. Sanchez-Guerrero, Gerardo S.-De la Torre, and Lourdes H. Vazquez. Prevalence of anti-SSA (Ro) antibodies in a Mexican Population of patients with various systemic. *Rheumatic Diseases*. *J Rheumatol* 14:479 - 481,1987.

69.- Alspaugh M, Maddison p: Resolution of the identity of certain antigen - antibody systems in systemic lupus erythematosus and sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum*: 22:796 - 798,1979.

70.- Elaine L. Alexander, M.D., Ph. D. ; Frank C. Arnett, M.D. ; Thomas T. Provost, M.D. ; and Mary Betty Stevens, M.D. ; Baltimore, Maryland. Sjogren's syndrome; Association of anti - Ro (SS-A) Antibodies with vasculitis, Hematologic Abnormalities, and serologic Hyperreactivity. I. *Medicine* 98:155-159.1983.

71. - Margaret Alspaugh and Peter Moddison. Resolution of systemic lupus erythematosus and sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Brief Reports*: 796-798, 1978.

72. - Michael b. Roder, Charles O'Brien, Yunshang Liu, John B. Harieu, and Morris Reichlin. Heterogeneity of the Ro - SSA Antigen. *Different Molecular Forms in Lymphocytes and Red Blood cells*. *J. Clin. Invest.* 83. April : 1293 - 1298, 1989.

Este trabajo se realizo con el apoyo No. 89 - MB - 1297 - 01 - 3782
del departamento de Investigación Científica y Superación Académica
(DICSA), Universidad de Guadalajara, México.
Hospital General de Occidente de S.S., Departamento de
inmunología, México.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección

Expediente

Número

C. CRISTINA RODRIGUEZ PATINO.
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL ANTIGENO SS - A (Ro) EN ENFERMEDADES REUMATICAS GENERALIZADAS", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. IGNACIO GARCIA DE LA TORRE.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "

"AÑO DEL BICENTENARIO"

Guadalajara, Jal., 09 de Abril de 1992.

EL DIRECTOR

M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

SECRETARÍA DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

M. EN C. MARTÍN PEDRO TENA MEZA

c.c.p.- Dr. Ignacio García De La Torre..Director de tesis.pte.-
c.c.p.- El expediente del alumno.

CBZ:MPTM:Glr.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número