

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES: ROL PATOGENICO E IMPORTANCIA CLINICA.

Dras. Patricia Calderon y Ana María Guzman
 Unidad de Inmunología, Departamento de
 Medicina Hospital J.J. Aguirre.

INTRODUCCION

Los anticuerpos antinucleares (AAN) son importantes herramientas del laboratorio inmunológico que permiten un diagnóstico y evaluación más precisa de las enfermedades autoinmunes. Ellos corresponden a un grupo de anticuerpos dirigidos contra diversos elementos intranucleares. Su presencia en algunos individuos que padecen enfermedades autoinmunes y también en sanos, es un misterio aún no completamente develado. Tampoco se ha aclarado cómo su presencia se relaciona con la variada gama de manifestaciones clínicas que afectan tan diversos parénquimas. ¿En que momento se producen estos autoanticuerpos? ¿Son producidos primariamente y luego capaces per se de producir daño mediado por el sistema inmune? o bien tras haber un fenómeno de daño tisular con liberación de proteínas intracelulares?. Hasta hoy estas hipótesis son intensamente debatidas. Los AAN son inmunoglobulinas dirigidas contra distintos antígenos nucleares, tales como: ácidos nucleicos (DNA y RNA), proteínas básicas o histonas y proteínas ácidas tales como antígenos nucleares extractables o ENA.

Se han llevado a cabo grandes esfuerzos para identificar aquellas regiones específicas del autoantígeno que son reconocidas por el autoanticuerpo, esto se ha logrado mediante el mapeo de epítopes. Un epítopo puede ser definido como un grupo de aminoácidos en un antígeno (Ag) que es reconocido por un determinado anticuerpo (Ac) o bien por el receptor del linfocito T. Un autoAg puede tener uno o múltiples epítopes. Uno de los objetivos del mapeo

de epítopes ha sido identificar regiones del autoAg que pudieran reaccionar cruzadamente con patógenos ambientales, situación que ha sido ligada a la etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes. (Galperin).

Los auto Ac pueden ser naturales, y estar presentes en individuos aparentemente sanos, o ser patológicos y estar ligados a enfermedad. (Tabla 1).

Los AAN son inespecíficos pero de alto valor por su sensibilidad. Sobre un 90% de los pacientes con Lupus Erite matoso Sistémico (LES), Esclerodermia y Enfermedad mixta del tejido conectivo tienen altos títulos de AAN en un rango de dilución que va desde 1:1280 a 1:10000, en períodos de actividad de la enfermedad.

Sin embargo pueden ser falsamente positivos en ancianos, pacientes con linfomas, infección VIH, y mujeres jóvenes en tratamiento con anticonceptivos orales. También pueden expresar AAN pacientes en tratamiento con hidralazina, procainamida, isoniazida y anticonvulsivantes, sin evidencias aún de que este hecho se asocie a algun cuadro patológico.

TABLA N°1

AUTOAC NATURALES	AUTOAC PATOLOGICOS
Presentes en sanos.	Pueden estar presentes en sanos pero generalmente se encuentran asociados a enfermedad órganoespecífica.
No ligadora condiciones patológicas.	Ligados a condiciones patológicas
Son Ig polirreactivas, IgM de baja afinidad	Ig G de alta afinidad.
Generalmente presentes en baja concentración.	Presentes en alta concentración.
Participarían en eliminación de elementos celulares de degradación y defensa contra infecciones.	No alacarado el mecanismo de acción en la patogenia, excepto para auto Ac fijados al complemento en nefritis lúpica.

ESTUDIO DE AAN

Ante la sospecha de una enfermedad autoinmune se debe solicitar el estudio de AAN para lo cual se utiliza una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) cuyo sustrato es una línea de células tumorales humanas (células HEP-2), que tienen una relación núcleo/citoplasma mayor que la de células normales, permitiendo precisar con mayor facilidad los patrones de inmunofluorescencia antinucleares. Otros sustratos tales como cortes de hígado y riñón de rata pueden ser usados pero no tienen las ventajas de células HEP-2. Los sueros que resultan positivos a este examen, se titulan.

Un 5% de la población normal expresa este examen positivo, pero generalmente en títulos bajo 1:320.

Al observar estos núcleos celulares se pueden encontrar distintos patrones, los cuales han sido relacionados con diversos autoantígenos nucleares, y por lo tanto orienta a determinado tipo de enfermedad autoinmune (Tabla 2).

Estos antígenos habitualmente representan complejos entre ácidos nucleicos y proteínas. En

general, el patrón homogéneo es el más inespecífico y se ve en muchos pacientes con Artritis Reumatoide y otras enfermedades del tejido conectivo, también en infecciones crónicas y algunas enfermedades hepáticas.

El patrón RIM o Periférico es de alta especificidad en pacientes con LES.

Los patrones nucleolar y moteado se asocian con la presencia de Ac anti ENA, los que incluyen Sm, RNP, Ro, La, Scl-70, Jo-1 y Ku.

Según la clínica y el patrón de inmunofluorescencia se solicitará un estudio más específico destinado a detectar el tipo de AAN implicado, este estudio se solicitará en las siguientes circunstancias:

- Clínica que apoye fuertemente el diagnóstico de LES o condición asociada y estudio de AAN sea negativo.
- Criterios incompletos para diagnóstico de LES.
- Clínica poco sugerente de enfermedad autoinmune pero AAN resultaron positivos (*Teodorescu*).

La tabla 4 muestra la correlación entre AAN y algunas enfermedades autoinmunes.

Este test se realiza por medio de kits de ELISA que son rápidos, fáciles de realizar y no requieren de manipulación de elementos radioactivos. Otra técnica que puede emplearse es la doble inmunodifusión, pero hoy en día se privilegia el uso de técnicas más precisas y reproducibles.

A continuación se expone una visión general de cada autoAg.

DNA

Para ser antigénico, el DNA debe siempre estar asociado a proteínas (ej:histonas) formando estructuras denominadas nucleosomas. Los auto Ac anti DNA del LES son reactivos con DNA de doble hebra (dsDNA), también puede encontrarse en estos pacientes autoAc reactivos con DNA nativo (ssDNA), siendo estos últimos menos específicos para LES. Para la detección de estos autoAc se

TABLA 2

PATRONES FANA	AAN ASOCIADOS	CORRELACION CLINICA
HOMOGENEO	anti histonas	LES, Lupus por drogas, RIM
PERIFERICO	anti DNA	LES
MOTEADO	anti UIRNP	LES, EMTC
	anti Sm	LES
	anti La	LES, Sjögren
	anti Ro	LES, Sjögren
	anti Ku	LEL, Esclerodermia
	anti PCNA	LES
	anti TOPO I	Esclerodermia
NUCLEOLAR	anti centromero	CREST
	anti Th, anti U3RNP,	Esclerodermia
	anti RNA pol I,	
anti PM-Scl		
CITOPLASMICO	anti t RNA sintetasa	Polimiositis
	ribosomal	LES

Fuente: Kelley, Harris, Ruddy, Sledge.

TABLA 3

PERFIL DE AAN CARACTERISTICO DE ALGUNAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

LES:

ds DNA 40% (específico)

ss DNA 70% (inespecífico)

Ac antihistonas en 50-70% de pacientes con enfermedad activa (inespecífica)

Ac anti Sm en 10-30% (altamente específicos)

Ac RNP en 10-20%, se han relacionado con manifestaciones neuropsiquiátricas.

Ac anti Ki/SL en 20% se ha asociado con mayor incidencia de fibrosis pulmonar y alteraciones del SNC.

Enfermedad mixta del tejido conectivo:

Ac anti UIRNP (p70) presente en casi el 100%

Ac anti Scl-70 (DNA Topo I) define casos mas severos de esclerodermia. Presente en 75%.

Son específicos, tienen correlación aun no confirmada con fibrosis pulmonar.

Ac anticentromeros (ACA) presente en 80% de pacientes con CREST.

Dermatomiositis y Polimiositis:

Ac anti aminoacil t RNA sintetasa presentes en 25-30%. Se correlaciona con enfermedad pulmonar intersticial, artritis y Reynaud.

Fuente: Galperin.

pueden utilizar diversas técnicas tales como IFI en un dinoflagelado conocido como *Crithidia luciliae*, el RIA de Farr y ELISA.

Ha sido demostrado en modelo murino in vivo que Ac monoclonales anti DNA son capaces de penetrar en células y una vez dentro se uniran a DNAsa I entrando al núcleo. Se cree que durante la inflamación estos Ac internalizados modificarían eventos apoptóticos. (Isenberg)

HISTONAS

Son proteínas que se unen al DNA y junto a este forman los nucleosomas (o unidad básica de cromatina), también son importantes en la regulación de la transcripción del DNA.

Hay 5 tipos de histonas presentes en el núcleo. AutoAc antihistonas han sido detectados en diversas

patología, por lo que se les considera inespecíficos. Se pueden encontrar en la mayoría de los pacientes en tratamiento con procainamida o hidralazina, conocidas productores de Lupus inducido por drogas.

Sm

El Ag Sm pertenece a una familia de pequeñas ribonucleoproteínas (snRNP), asociadas con un tipo particular de RNA. Han sido implicadas en la división del RNA mensajero. Su hallazgo es de gran valor en LES, reportándose en un 10-30% de ellos, lo que tal vez podría ser una subestimación ya que se ha reportado una pérdida de péptidos Sm durante la preparación de las células. (Galperin).

ANTIGENO DE PROLIFERACION NUCLEAR (PCNA)

Es una proteína reguladora del ciclo celular, esencial para la replicación y reparación del DNA.

Se presenta en LES entre un 4 y 18%, sin haber sido asociado a determinadas características clínicas.

RNP RIBOSOMALES

También denominados proteínas P, se asocian con la unidad ribosomal mayor. Su función no ha sido totalmente aclarada, pero estarían envueltos en la síntesis proteica a nivel ribosomal.

Se ha relacionado en algún grado su presencia con manifestaciones neuropsiquiátricas del LES.

Ku

Es una proteína nuclear heterodimérica, que se une a DNA de doble cadena. Esta presente en pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo, y también en enfermedad de Graves y Sd de Sjögren.

Ki/SL

Es una proteína nuclear no histona de función desconocida. Se la ha asociado con presencia de mayor incidencia de fibrosis pulmonar y compromiso SNC de pacientes con LES.

UIRNP

Esencial en la división del precursor de mRNA. Su presencia tiene una correlación de un 100% con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC). Está presente en el 30% de casos de LES.

DNA TOPOISOMERASA (Scl-70)

Topoisomerasa I es la encargada de la relajación del DNA superenrollado fundamental para la replicación y transcripción del DNA. Su presencia define a un grupo de pacientes con una forma difusa y más severa de escleroderma describiéndose hasta en un 75% de ellos.

De hecho constituyen un marcador serológico de esta enfermedad, ya que no aparecen en ninguna otra. También se ha ligado a la fibrosis pulmonar en pacientes con escleroderma.

CENTROMERO / KINETOCORO

El centrómero se define como la región de la constricción primaria del DNA, y tendría un rol fundamental en la segregación simétrica de los cromosomas en la división celular. El kinetocoro es una estructura trilamelar en el centrómero que sirve como punto de anclaje del cromosoma al huso mitótico. Tres Ag o proteínas del centrómero han sido descritas: CENPA, B y C. AutoAc contra estos Ag se encuentran en un 80% de pacientes con CREST. La presencia conjunta de Ac anti Topo I y anti centrómero parecería ser mutuamente excluyente.

FIBRILARINA

Es una proteína nucleolar que participaría en la etapa inicial de procesamiento de RNA Ribosomal.

Mediante técnicas de Western Blot, han sido detectados autoAc contra ésta proteína en un 58% de pacientes con escleroderma, aunque no son específicos de ésta patología.

PM-Scl

Este autoAg se localiza predominantemente en el componente granular del nucléolo. Se desconoce

su función. Se ve en 50-70% de pacientes con superposición de enfermedades autoinmunes.

RNA POLIMERASAS

Son un complejo multiproteico que participa en la transcripción de diversos genes a RNA. Existe la RNAP I, II y III y auto Ac contra RNAP I y III son altamente específicos de escleroderma.

REGION ORGANIZADORA DEL NUCLEOLO-90 (NOR-90)

Es el promotor de la transcripción de RNA Pol I, está compuesto por distintas proteínas no histona, raramente se ve en pacientes con escleroderma o Reynaud.

AMINOACIL T RNA SINTETASAS

Son una familia de 20 enzimas cuya función es catalizar la unión de tRNA con su respectivo aminoácido, con una enzima única para cada aminoácido. Ac contra esta enzima han sido asociados a miopatías inflamatorias autoinmunes, polimiositis (PM) o dermatomiositis (DM). Ellas incluyen anti Jo-1, anti PL-7, anti PL-12, anti EJ y anti OJ. Su presencia se ha relacionado con mayor prevalencia de enfermedad pulmonar intersticial en estos pacientes.

Mi-2

Es un autoAg nuclear de función desconocida. Es el único autoAc con una fuerte asociación con DM, siendo una gran ayuda en el diagnóstico de esta afección.

SS-A/Ro y SS-B/La

SS-A/Ro es una proteína que forma complejos con RNAs. Se desconoce su función y su ubicación exacta, podría estar en el núcleo o en el citoplasma o en ambas.

SS-B/La es una fosfoproteína presente en el núcleo que participa en la terminación correcta y eficiente de la transcripción de RNAP III.

Su asociación mas importante es en pacientes con

lupus neonatal que presentan SS-A/Ro en 95% y en lupus eritematoso cutáneo subagudo en un 80%. También en 70% pacientes con Síndrome de Sjögren.

Se ha asociado mayor prevalencia de nefritis en pacientes con LES y anti Ro solo. Al parecer habría algún tipo de sinergia entre anti Ro y anti DNA para producir una mayor incidencia de nefritis o mayor severidad en pacientes con LES con ambos Ac. (*Ben Chetrit*). Otro hecho interesante con respecto al Ag Ro es su presencia en queratinocitos humanos y su expresión aumentada tras irradiación UV. Esto podría relacionarse con las manifestaciones de fotosensibilidad de pacientes con LES. (*Ben Chetrit*)

Ac anti SS-B/La se ven en 50% de pacientes con Síndrome de Sjögren y 15% pacientes con LES.

ROL PATOGENICO DE LOS AAN

Como se adelantara al inicio de esta revisión, está es un área en que hay mas dudas que certezas, y a continuación expondremos algunos hechos que han ido siendo conocidos al respecto, durante la última década.

- En general es sabido que el DNA y RNA son poco inmunogénicos (capacidad de generar una respuesta inmune) en individuos sanos, pero al estar unidos a proteínas formando nucleosomas, aumentaría su inmunogenicidad, de hecho los Ac anti DNA realmente son Ac contra complejos DNA-proteínas. (*Hilliquin*)
- Los Ac anti ds DNA han sido correlacionados con nefritis lúpica activa, ya que complejos inmunes de este tipo se han encontrado depositados en la membrana basal del glomérulo de estos pacientes.
- Se desconoce el mecanismo por el cual el DNA nuclear llega al extracelular y se hace accesible a Ac circulantes. Algunas observaciones in vitro de linfocitos T de pacientes con LES han demostrado una alteración en la apoptosis de estas células lo que proveería una fuente extracelular necesaria para producir una

respuesta inmune y la formación de complejos inmunes patogénicos. (*Galperin*).

- Ac anti DNA en LES son capaces de unirse a epítopes de lamininas, las cuales se encuentran en la membrana basal del glomérulo, estos AAN se correlacionan con el grado de actividad de la enfermedad. En ratones se han descrito Ac anti DNA el cual tras unirse a la superficie celular es capaz de penetrar hasta el núcleo donde se unirían a DNA sa tipo I. Se ha propuesto que durante la inflamación, los Ac internalizados modificarían eventos apoptóticos al unirse a la DNAsa I o servir como Ag en la superficie celular para factores reumatoídeos circulantes. (*Isenberg*).
- Existe un elevado nivel de ácidos nucleicos circulantes en el suero de pacientes con LES, lo que indicaría un mecanismo de clearance defectuoso. Se desconoce si estos podrían servir como antígenos, pero algunos estudios muestran una sorprendente homología con la región Gag-Pol del VIH-1. No se sabe si esto indicaría una participación de algún retrovirus en la patogenia del LES. (*Isenberg*).

COMENTARIO FINAL

Los AAN son una importante ayuda diagnóstica de enfermedades autoinmunes, un seguimiento de los títulos son un útil índice de progresión de la enfermedad y de éxito terapéutico.

Al pedir el screening AAN en células hep-2 se informa el patrón específico, por lo que no es necesario pedir Ac anticentrómero por separado.

Un examen negativo no descarta la presencia de enfermedad autoinmune, ya que LES presenta un 5 a 10% de ANN negativos.

De todos los anticuerpos revisados, en la práctica los mas solicitados son:

- screening AAN por IFI
- ENA (Ro, La, Sm, RNP, Jo 1, Scl-70) por ELISA.
- Anti DNA por ELISA.

Considerando que a futuro irán conociéndose nuevos autoAg nucleares es posible que se produzcan fenómenos de superposición por lo que es muy importante buscar estos autoAg por técnicas distintas y complementarias.

REFERENCIAS

1. Galperin C., Leung P., Gershwin M. *Molecular biology of autoantigens in rheumatic diseases. Rheumatic diseases Clinics of North America* 1996; 22 :175-210.
2. Teodorescu M. *Multiparameter ELISA testing for autoantibodies in rheumatology Clinical immunology Newsletter* 1992; 12 : 49-58.
3. Isenberg D., Anisur Rahman M., Ravirajan Ch., Kalsi J. *Anti DNA antibodies: from gene usage to cristal structures. Immunology Today* 1997; 18 (4): 149-153.
4. Ben Chetrit E. *The molecular basis of the SSA/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. British J. of Rheumatology* 1993; 32: 396-402.
5. Hilliquin P. *Biological markers in inflamatory rheumatic diseases. Cell Mol Biol* 1995; 41 : 993-1006.
6. Senecal JL, Ichiki S, Girard D, Raymond Y. *Autoantibodies to nuclear lamins and to intermediate filament proteins natural, pathologic, or pathogenic?. The Journal of rheumatology* 1993; 20:2.
7. Kelley, Harris Ruddy, Sledge *Textbook of Rheumatology Cuarta edición, 1993.*