

# Anticuerpos Dna como Ayuda en el Diagnóstico de Lupus Eritematoso Diseminado y otras Enfermedades Inflamatorias o Neoplásicas

*Dr. Alvaro Gutiérrez D.\**

*Dra. Ana Abigail Porras M.\*\**

*Dr. Ricardo Castro D.\*\*\**

La determinación de anticuerpos DNA de doble hélice, ha sido utilizada en el diagnóstico de Lupus Eritematoso Diseminado, sin embargo, los anticuerpos de hélice simple, más fáciles de determinar en el laboratorio, no han sido evaluados ampliamente para el diagnóstico de Lupus Eritematoso y Artritis Reumatoidea. En el presente estudio, fue utilizada la técnica de cuantificación de los anticuerpos DNA de hélice simple, por absorción y contraelectroforesis.

Pacientes con LED mostraron títulos elevados de anticuerpos DNA en forma constante mientras que la AR, fueron variables.

Se concluye que esta prueba, asociada a otros parámetros, es de gran ayuda diagnóstica.

## MATERIALES Y METODOS

Nos basamos que éste trabajo en el estudio de 500 pacientes internados en el Hospital San Juan de Dios con diversas patologías. Ciento tres pacientes en estudio fueron diagnosticados con los criterios clínicos y de laboratorio usuales, como LED o Artritis Reumatoidea (AR). Los criterios

\*Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Depto. de Análisis Clínicos.

\*\*Hospital San Juan de Dios, Laboratorio Clínico, Sección de Hematología.

\*\*\*Hospital San Juan de Dios, Sección Ortopedia.

Clínicos en que nos basamos para la clasificación como AR o LED fueron los siguientes:

AR: poliatralgias con flogosis articular, presencia de rigidez o deformidades articulares, nódulos subcutáneos.

LED: erupción cutánea eritematosa en cara, cuello o extremidades. Artritis o polioartritis, pleuresía. Síndrome de Raynaud o nefritis. Para LED, la presencia de células LE en el transcurso de la enfermedad fue un factor indispensable en el diagnóstico.

Pacientes en que el diagnóstico de certeza no pudo establecerse, no fueron considerados en el análisis de los datos, en los que se incluyó únicamente, lupus eritematoso diseminado o AR bien definidos. Otro grupo de pacientes con diversas patologías en las que se incluyen trastornos renales, cardíacos, problemas hematológicos, colelitiasis, colecistitis y algunas virosis fueron estudiados pero no incluidos en este reporte. Se incluye en el estudio, 100 sueros de personas aparentemente normales.

Estos sueros fueron analizados hasta donde fue posible el mismo día de la extracción o fueron guardados en congelación, por un período no mayor de 48 horas antes de ser procesados.

Después de analizados fueron guardados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; un porcentaje de

ellos, (20%) fueron estudiados nuevamente por anticuerpos después de 4-6 meses para observar si la congelación afectaba de alguna manera los títulos obtenidos. Los anticuerpos que son de hélice simple, se midieron siguiendo la modificación de Arquembourg que brevemente se describe de la siguiente manera:

#### 1° Fase de absorción del anticuerpo

Se utiliza placas de microtitulación en U (Cooke Engineerie Co). En cada huequecillo se coloca 0.025 ml. de búffer Tris pH .8. En el huequecillo 1°, se coloca 0.025 ml. de DNA\* con una concentración de 5.12 mg/ml preparado en búffer Tris, desnaturalizado por calentamiento en baño de agua a ebullición por 10 minutos. Se hace diluciones dobles seriadas hasta el huequecillo número 6 para obtener concentraciones de DNA de 2.56 mg/dl a 0.8 mg/dl. Posteriormente se agrega 0.025 ml de suero a cada uno de los huequecillos, se mezcla y se incuba a 37°C para su absorción, durante una hora. \*(Calf Thymus, tipo V. Sigma Chemical Co.)

#### 2° Fase de contraelectroforésis (CEP)

Se preparan placas de vidrio de 31/4x x 4 pulgadas (Kodak proyector slide) recubiertas con Ionagar al 0.8% (Ionagar N° 2 Oxoid) en búffer Tris 6.8.

Se perforan hileras pares de huequecillos separados 5mm entre sí, con 2mm de diámetro. Se practica una CEP a 50 voltios, por 30 minutos en el suero absorbido, contra una solución de DNA 0.2 mg/ml desnaturalizado por calor.

Posteriormente se tiñen, con una solución de Pyronina Y al 0.05%; para identificar las líneas de precipitación. Consideramos que no era necesario hacer titulaciones intermedias entre las escogidas por lo que mantuvimos los títulos de 80, 160, 320, 640, 1280, 2560 como las diluciones de trabajo en todo estudio. En todos los sueros estudiados, se practicó la determinación de células LE, RA y anticuerpos antinucleares en látex y titulación de complemento.

### RESULTADOS Y DISCUSION

De los 600 sueros analizados, 22 corres-

pondían a pacientes con LED, 81 con AR, 100 a personas aparentemente sanas y el resto a diversas patologías.

Los cuadros I y II corresponden a la distribución de frecuencias de los títulos de anticuerpos DNA en LED y AR respectivamente.

Para LED, observamos que los títulos oscilaron entre 640 y 2560 con una mayor incidencia en los títulos de 2560; en ninguno de los casos analizados, se obtuvo niveles menores a 640. Todos los casos de LED, excepto uno, pertenecían al sexo femenino.

Comparativamente encontramos en AR, una diversidad en los niveles de anticuerpos que oscilaron desde los más altos en 2560 hasta negativas; predominaron en esta enfermedad, los títulos de 640 que representaron un 31% de la muestra. Estos hallazgos vienen a corroborar lo descrito en la literatura sobre el apareamiento de anticuerpos DNA en otras enfermedades del tejido conectivo como son la AR y la AR juvenil (16, 19). Una distribución de los resultados anteriores por sexo, no mostró una diferencia significativa.

Las tablas III y IV nos muestran una distribución de los títulos de anticuerpos encontrados en estas dos enfermedades citadas por edades. Del análisis del cuadro se desprende que la edad no tiene relación directa con niveles de anticuerpos.

Durante la Fase aguda y mientras el paciente no recibió tratamiento se observaron títulos de anti DNA altos, con niveles bajos de complemento que oscilaron entre 0 y 80 unidades de complemento 50% (CH50). Esto concuerda con los resultados de varios investigadores (20, 21, 22) con anti DNA de doble hélice.

Por espacio de un año tuvimos oportunidad de obtener muestras seriadas de 5 pacientes con LED, que se presentaron a la Consulta Externa del Hospital San Juan de Dios para recibir atención en forma periódica; logramos observar que durante el tiempo en que se mantuvo el tratamiento, los títulos de anti DNA bajaron y los niveles de complemento aumentaban hasta recuperar sus valores normales.

La titulación de complemento en AR no mostró cambios significativos en las muestras de los pacientes examinados oscilando los

valores entre 80—45 u CH50 como se anota en la tabla V. Tanto a los pacientes con LED como a los de AR, se les practicó determinaciones de anticuerpos antinucleares y prueba para AR en látex.

Los pacientes con LED fueron positivos en un 47% para la prueba de AA (látex) y un 6% para AR (Látex). Por otra parte los pacientes con Artritis Reumatoidea fueron positivos en un 60% para la prueba de AR (látex) y todos negativos para AA (látex).

Como puede observarse en la tabla VI, en los pacientes con AR no encontramos una relación directa entre los títulos de anti DNA y los títulos de RA (Látex). Los títulos de anti DNA obtenidos para otras patologías son muy variados, encontrándose muy elevadas, al igual que en LED, únicamente en pacientes con hepatitis viral y algunos linfomas (Gutiérrez y col. en preparación).

La tabla #7 muestra una distribución en población aparentemente normal observándose que el 96% de los pacientes muestran títulos menores de 1280 sin encontrarse diferencias significativas por edad.

Con el fin de demostrar la estabilidad del anticuerpo DNA, en los sueros analizados, se practicaron determinaciones a 100 muestras de diferentes títulos luego de permanecer en congelación por espacio de 4—6 meses; no se observaron cambios significativos en los títulos originalmente obtenidos.

## CONCLUSIONES

No existen pruebas de laboratorio de

verdadero valor diagnóstico de artritis reumatoidea.

Las pruebas de Látex para AA y AR, no son parámetros confiables en el diagnóstico de estas dos entidades clínicas dado el importante número de falsos negativos que se observan en las pruebas.

La determinación de anticuerpos DNA es más específico para el diagnóstico de LED ya que todos los pacientes mostraron tener títulos altos, mientras que aquellos con AR presentaron títulos variables. Es importante realizar determinaciones del complemento sérico con las de anticuerpos DNA ya que la asociación de títulos altos de anti-DNA con niveles bajos de complemento sérico es la característica más comúnmente encontrado en pacientes con LED.

La disminución importante de los títulos de anti-DNA en pacientes con LED sometidos a tratamiento médico, nos permite recomendar esta técnica como valioso indicador de la respuesta del paciente al tratamiento médico.

## AGRADECIMIENTO

Este proyecto fue financiado parcialmente con fondos de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica bajo el proyecto 002—007—038.

Los autores agradecen a los Doctores Jorge Collado y Rafael Carmona por su asistencia técnica y al Dr. Víctor Ml. Villarejos en la revisión del manuscrito y sus valiosas observaciones sobre el proyecto original.

Tabla # 3

**DISTRIBUCION POR EDADES DE TITULOS DE ANTI-DNA  
EN LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO**

TITULOS DE ANTI DNA								
Grupo de edades	0	80	160	320	640	1280	2560	r
10-19	0	0	0	0	1	0	0	1/1
20-29	0	0	0	0	1	2	2	5/5
30-39	0	0	0	0	0	1	3	4/4
40-49	0	0	0	0	0	1	2	3/3
50-59	0	0	0	0	0	0	0	0
60- +	0	0	0	0	1	1	0	2/2
desc.	0	0	0	0	0	2	5	7/7
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>22/22</b>

Tabla # 4

**DISTRIBUCION POR EDADES DE TITULOS DE  
ANTI-DNA EN ARTRITIS REUMATOIDEA**

TITULOS DE ANTI DNA								
Grupo de edades	0	80	160	320	640	1280	2560	r
10-19	2	0	1	0	4	1	0	6/8
20-29	3	0	1	2	2	1	1	7/10
30-39	2	0	0	0	3	0	0	3/5
40-49	1	0	1	2	5	1	1	10/11
50-59	1	0	2	0	1	3	0	6/7
60- +	2	0	1	1	2	1	1	6/8
desc.	2	0	5	3	5	8	6	27/29
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>65/80</b>

Tabla # 5

NIVELES DE COMPLEMENTO (CH50) Y ANTI DNA  
EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA

PACIENTE	NIVELES DE C'	NIVELES DE ANTI DNA
O.N.C.	80	Neg.
W.F.A.	97	640
A.F.B.	100	640
H.P.B.	120	1280
R.R.V.	122	1280
J.N.B.	125	640
M.J.M.	130	640
J.D.M.	130	640
E.J.N.	150	1280
M.S.M.	150	1280
D.M.P.	170	640
M.B.M.	170	640
J.M.A.	180	160
M.G.G.	230	Neg.
M.C.H.	235	1280
C.M.H.	295	640
C.M.Ch.	315	320

Tabla # 6

RELACION ENTRE TITULOS DE ANTI DNA  
Y RA TEST EN ARTRITIS REUMATOIDEA

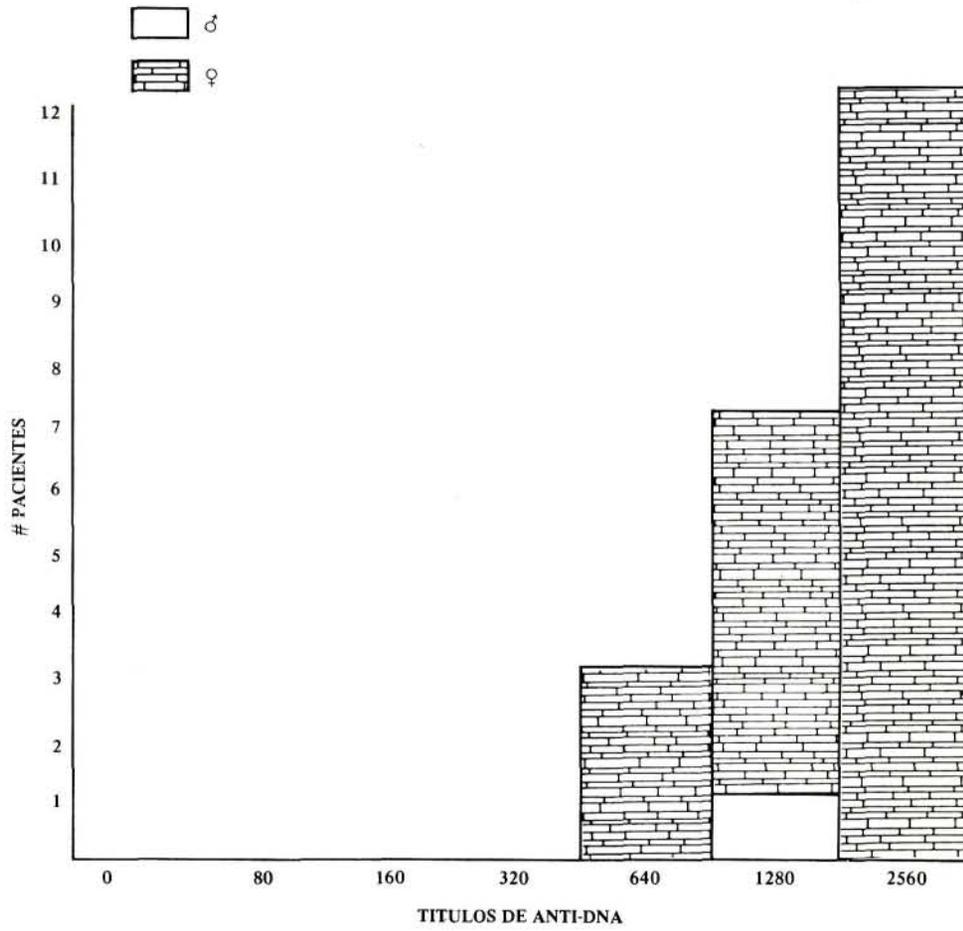
TITULOS DE RA	TITULOS DE ANTI DNA							
	0	80	160	320	640	1280	2560	r
320	0	0	0	0	1	2	0	3/3
160	1	0	0	0	0	2	0	2/3
80	0	0	1	0	0	3	0	4/4
40	0	0	1	0	0	0	0	1/1
20	3	0	3	1	4	2	0	10/13
10	0	0	0	0	1	0	0	1/1
Neg.	4	0	0	5	10	3	1	19/23
TOTALES	8	0	5	6	16	12	1	40/48

Tabla # 7

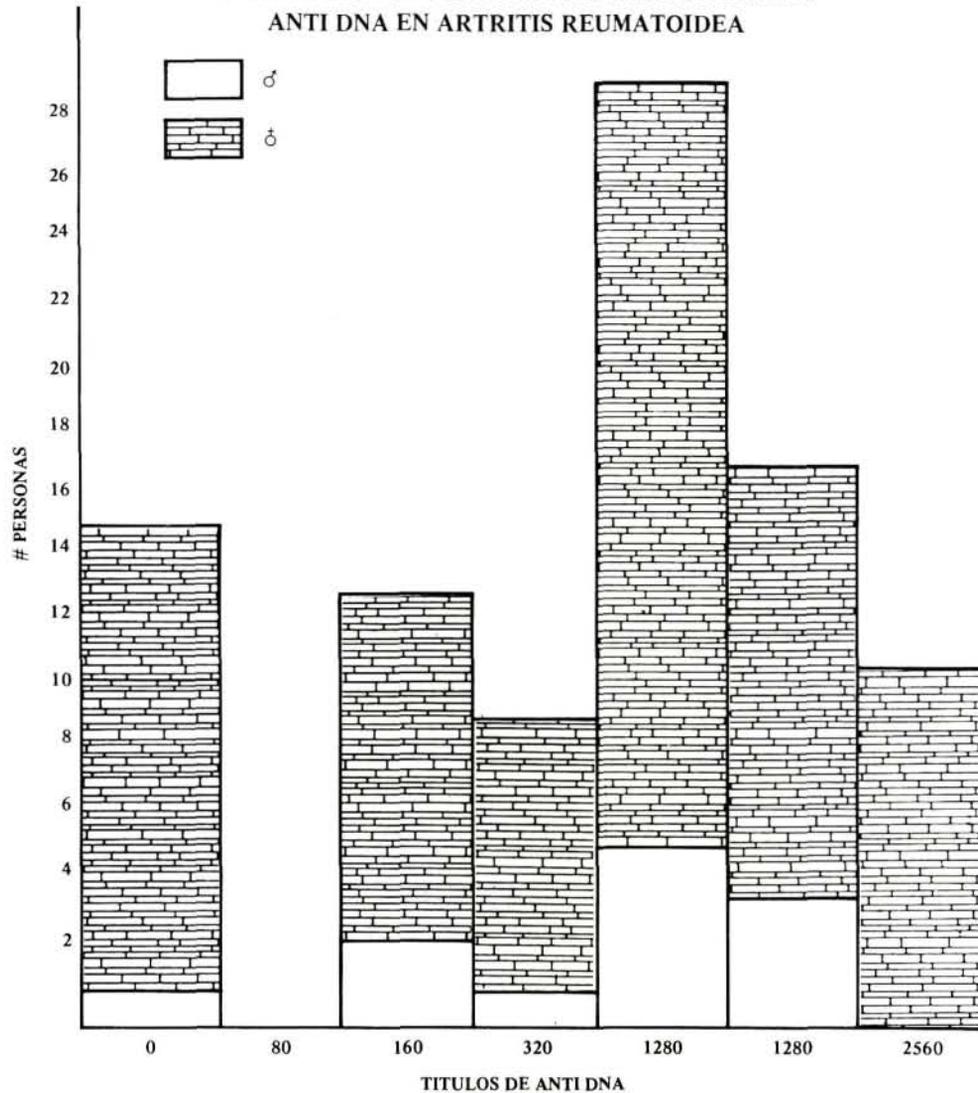
DETERMINACION DE ANTICUERPOS DNA EN POBLACION NORMAL

TITULOS DE ANTI DNA							
Grupo de edad	N° examinado	TITULOS DE ANTI DNA					
		-5	20	40	80	160	320
10-14	7	4	1	1	0	0	1
15-19	23	18	1	0	3	1	0
20-29	24	20	0	2	2	0	0
30-39	20	15	0	1	2	2	0
40- +	26	20	0	4	2	0	0
TOTAL	100	77	2	8	9	3	1

**CUADRO I**  
**DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS POR TITULOS DE**  
**ANTI-DNA EN LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO**



CUADRO II  
DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS POR TITULOS DE  
ANTI DNA EN ARTRITIS REUMATOIDEA



#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- ROBBINS W. C., HOLMAN H.R., DEICHER H.: et al. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 96:575, 1957.
- 2.- DEICHER H., HOLMAN H.R., KUNKEL H.: The precipitin reactin between DNA and a serum factor in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 109:97, 1959.
- 3.- GERSHWIN, E., STEINBERG A.: Qualitative characteristics of anti DNA antibodies in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 17:947, 1974.
- 4.- TAN E. M., SCHUR, P., CARR R.: et al. Deoxyribonuclei acid DNA and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin Invest.* 45:1732, 1966.
- 5.- ARANA R., SELIGMANN, M.: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic

- acid in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 46:1867, 1967.
- 6.- TAN, E., SCHUR, P., CARR R., Kunbel, H.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 45:1732, 1967.
  - 7.- CEPPELLINI R., POLLI, E., CELADA F.: A DNA reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:572, 1957.
  - 8.- BOZICEVICH J., NASOU J. P., KAYHOE E.: Deoxyribonucleic acid (DNA) bentonite flocculation test for lupus erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103-636, 1960.
  - 9.- JOKINEN, E.J., JULKUNEN H.: DNA Haemagglutination test in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum. Dis.* 24:477, 1965.
  - 10.- BENNETT, R., MOLINA ELENA: Measurement of DNA antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 65 (364), 1976.
  - 11.- PINCUS, T., ROSE, J.: et al. Measurement of serum DNA binding activity in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 281: 701, 1969.
  - 12.- FARR, R.S.: A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between, I\* BSA and antibody. *J. Invest. Dis.* 103: 239, 1958.
  - 13.- PINCUS, T.: Immunochemical conditions affecting the measurement of DNA antibodies using ammonium sulfate precipitation. *Arthritis Rheum.* 14: 623, 1971.
  - 14.- DAVIS, J.: Determination of DNA and anti DNA by counter-immunoelectrophoresis *Arthritis Rheum* 14:377, 1971.
  - 15.- JOHNSON, G., EDMONDS, J., HOLBOROW, E.: Precipitating antibody to DNA detected by two-stage electroimmune diffusion study SLE and rheumatoid arthritis. *Lancet* 2: 883, 1973.
  - 16.- SCHUR, P.: De Antibodies to nucleic acids and nuclear antigens by counterimmuno-electrophoresis. *Clin. Exp. Immunol.* 17: 209, 1974.
  - 17.- DORSCH, C., BARNETT E.V.: The occurrence and nature of precipitating antibodies in anti-DNA sera *Clinical Immunology and Immunopathology* 2: 310, 1975.
  - 18.- ARQUEMBOURG, P.: *Immuno-electrophoresis* 2<sup>o</sup> ed. Basel Karger, pp. 1-104, 1975.
  - 19.- BELL, CARLYN., TALAL, N., SCHUR, P.: Antibodies to DNA in patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Art. and Rheum* 18: 535, 1975.
  - 20.- SCHUR, P., SANDSON, J.: Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 278: 533, 1968.
  - 21.- TEIBERG, P.: Complement System studies in SLE. *Acta Med. Scand* 197: 131, 1975.
  - 22.- CASALS, S., FRIOW, MYERS, L.: Significance of antibody to DNA in systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 7:379, 1964.