

# Anticuerpos contra los nucleosomas en el lupus eritematoso sistémico\*

M. Hernando<sup>1</sup>, C. González<sup>1,2</sup>, R. Carrasco<sup>1</sup>, JA. Navajo<sup>1</sup>, JM. González-Buitrago<sup>1,2</sup>

## Resumen

**Objetivo:** Los anticuerpos contra los nucleosomas desempeñan un papel fundamental en la patogénesis del lupus eritematoso sistémico (LES), fundamentalmente en la aparición de la nefritis lúpica. El objetivo del presente trabajo ha sido valorar la relación de los anticuerpos contra los nucleosomas con los anticuerpos contra las histonas y los anticuerpos contra el dsDNA y analizar la relación entre los diferentes anticuerpos con la actividad del lupus y la nefritis lúpica.

**Métodos:** Se analizaron los sueros de 40 pacientes con LES, 22 de ellos con enfermedad activa y 18 con enfermedad inactiva y 20 con nefritis lúpica y otros 20 sin nefritis. Los anticuerpos contra los nucleosomas se determinaron mediante inmunotransferencia puntual, los anticuerpos contra las histonas mediante enzoinmunoanálisis y los anticuerpos contra el dsDNA mediante enzoinmunoanálisis e inmunofluorescencia en *Crithidia luciliae*.

**Resultados:** Los resultados obtenidos indicaron una concordancia significativa baja ( $p < 0,05$ ) entre los resultados cualitativos de los anticuerpos contra los nucleosomas y los anticuerpos contra el dsDNA y las histonas. No hemos observado diferencias significativas en los tres anticuerpos analizados entre los pacientes con y sin nefritis. Existió una asociación significativa ( $p < 0,001$ ) entre la actividad del lupus y los anticuerpos contra el dsDNA medidos por enzoinmunoanálisis.

**Conclusión:** Los anticuerpos contra los nucleosomas poseen en el lupus una mayor prevalencia que los anticuerpos contra el dsDNA, aunque hay pacientes con anticuerpos contra los nucleosomas positivos y anticuerpos contra el dsDNA negativos y viceversa. Por este motivo, pensamos que en el momento actual aún deben medirse ambos anticuerpos y deben realizarse más estudios si se quiere sustituir la determinación de los anticuerpos contra el dsDNA por los anticuerpos contra los nucleosomas.

**Palabras clave:** anticuerpos contra el dsDNA, anticuerpos contra las histonas, anticuerpos contra los nucleosomas, lupus eritematoso sistémico.

## Summary: Antinucleosome antibodies in the systemic lupus erythematosus

**Objective:** Antinucleosome antibodies play a key role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE), mainly in the development of lupus nephritis. The objective of the present study was to assess the relationship of antinucleosome antibodies with anti-dsDNA and anti-histone antibodies and to analyze the relationship between the different antibodies with lupus activity and lupus nephritis.

**Methods:** Sera from 40 SLE patients were tested, 22 of them with active disease and 18 with inactive disease, and 20 with lupus nephritis and other 20 without nephritis. Antinucleosome antibodies have been measured by immunoblot, antibodies to histones by enzyme immunoassay and antibodies to dsDNA by enzyme immunoassay and immunofluorescence on *Crithidia luciliae*.

**Results:** The results obtained indicate a low significant agreement ( $p < 0.05$ ) between qualitative results of antinucleosome antibodies and antibodies to dsDNA and to histones. There were no significant differences in the three antibodies analyzed between SLE patients with and without nephritis. There was a significant ( $p < 0.001$ ) association between active lupus and anti-dsDNA antibodies measured by enzyme immunoassay.

**Conclusion:** Antinucleosome antibodies have a greater prevalence than anti-dsDNA antibodies in SLE, although there are patients with positive antinucleosome antibodies and negative anti-dsDNA antibodies, and on the contrary. For this reason, we think that at the moment both antibodies must be measured and more studies must be done if one wants to replace anti-dsDNA antibodies by antinucleosome antibodies.

**Key words:** anti-dsDNA antibodies, anti-histone antibodies, antinucleosome antibodies, systemic lupus erythematosus.

## INTRODUCCIÓN

Los nucleosomas son la unidad básica de empaquetamiento de la cromatina. Constan de una partícula central formada por un

octámero de dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 alrededor de la cual están enrollados 146 pares de bases de DNA de doble cadena; la histona H1 se encuentra en el punto en que el DNA entra y sale del nucleosoma (1). Los nucleosomas libres se generan durante la apoptosis celular por rotura de la cromatina por endonucleasas (2). En condiciones normales, las células apoptóticas se eliminan de la circulación sanguínea principalmente por los macrófagos (3).

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza por la presencia de anti-

<sup>1</sup>Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario de Salamanca

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Salamanca. Salamanca.

\*Este trabajo ha sido presentado en forma de póster en el XX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular celebrado en Cáceres del 3 al 5 de octubre de 2001.

cuerpos contra el núcleo (ANA) y, en particular, de autoanticuerpos dirigidos contra componentes individuales: el DNA de doble cadena (dsDNA), las histonas y algunas ribonucleoproteínas (4). La presencia de anticuerpos contra el dsDNA es uno de los once criterios del Colegio Americano de Reumatología (CAR) para el diagnóstico de LES (5).

A comienzo de los años 1990, se describió que los nucleosomas nativos pueden ser reconocidos como autoantígenos en los pacientes con LES (6). Los estudios posteriores han señalado que los anticuerpos contra los nucleosomas son más sensibles para el LES que cualquier otro anticuerpo dirigido contra antígenos nucleares (7-9). Los anticuerpos contra los nucleosomas se encuentran presentes tanto en el lupus activo como en el inactivo (8), aunque se ha señalado que el título de anticuerpo contra los nucleosomas está correlacionado con el índice SLEDAI, un índice de actividad del lupus (7,8), o con el índice ECLAM (9). Con relación a la nefritis lúpica, algunos estudios señalan que los anticuerpos contra los nucleosomas son más prevalentes en los pacientes con nefritis (9-11), mientras que otros no observan diferencias significativas de estos anticuerpos en los pacientes con y sin nefritis (12).

El objetivo del presente estudio fue estudiar los anticuerpos contra los nucleosomas, medidos mediante inmunotransferencia puntual, así como los anticuerpos contra el dsDNA medidos mediante inmunofluorescencia y enzimoimmunoanálisis de tipo ELISA y los anticuerpos contra las histonas, medidos por enzimoimmunoanálisis en tira, en un grupo de pacientes con LES y enfermedad activa e inactiva y con nefritis lúpica y sin ella.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Suero de los pacientes

Se analizaron 40 especímenes de suero de pacientes con LES que fue diagnosticado de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (5). Los sueros se obtuvieron por centrifugación tras la coagulación de la sangre y se almacenaron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo para las determinaciones de los autoanticuerpos.

La actividad del lupus se determinó por medio del índice SLEDAI (13). Veintidós pacientes tuvieron enfermedad activa (SLEDAI  $\geq 6$ ) y 18 tuvieron lupus inactivo (SLEDAI  $\leq 2$ ). La presencia de nefritis se estableció mediante biopsia renal en los casos en que ésta se había realizado y en los casos en que no se había hecho mediante datos bioquímicos como la presencia de proteinuria persistente y eritrocitos y/o cilindros en orina. El número de pacientes con nefritis lúpica fue de 20 y el de aquellos que no presentaron nefritis también 20.

### Determinación de anticuerpos contra los nucleosomas

Los anticuerpos contra los nucleosomas se determinaron mediante inmunotransferencia puntual utilizando el equipo comercial Alphadia Nucleosomes Dot kit (Immuno Hospitalar, Madrid). Se empleó para cada espécimen una tira de plástico con tres zonas reactivas; la del análisis contiene antígeno nucleosómico purificado de timo de ternera y las otras dos son para el control de la reacción y del valor discriminante. Los especímenes positivos son los que tuvieron una intensidad de color mayor que la del control del valor discriminante.

### Determinación de anticuerpos contra el dsDNA

Los anticuerpos contra el dsDNA se determinaron mediante dos ELISA comerciales (Varelisa, Pharmacia y Fresenius, Gull Laboratories) y mediante inmunofluorescencia en *Crithidia luciliae* (CLIFT). El Varelisa es un enzimoimmunoanálisis de tipo sandwich que utiliza un plásmido dsDNA circular recombinante que se une a los pocillos de las placas de microtitulación. Las determinaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante a  $25^{\circ}\text{C}$  en un sistema automático (Labotech, Chemila, Italia). De acuerdo con el fabricante, se consideró positivo el resultado por encima de 55 U/mL, mientras que fue dudoso entre 35 y 55 U/mL. El Gull es un enzimoimmunoanálisis indirecto que emplea DNA de timo de ternera unido a los pocillos de placas de microtitulación. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante en un sistema automatizado (Labotech, Chemila, Italia). De acuerdo con el fabricante se consideró positivo un resultado superior a 50 U/mL y dudoso el comprendido entre 30 y 50 U/mL.

Para la determinación mediante inmunofluorescencia se utilizaron portas de *Crithidia luciliae* de Inova Diagnostics (California, USA). Los portas de *Crithidia luciliae* se incubaron con una dilución 1:10 del suero. Se consideró un resultado positivo cuando se observó el cinetoplasto con una dilución del suero igual o superior a 1:10.

### Determinación de anticuerpos contra las histonas

Los anticuerpos contra las histonas se determinaron mediante enzimoimmunoanálisis en tira utilizando el sistema InnoLIA (Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Bélgica), que emplea como antígeno una mezcla de proteínas naturales H1, H2A, H2B, H3 y H4 a diferentes concentraciones. Este método es un método de detección sistemática (escrutinio) que necesita confirmación.

### Análisis estadístico

La concordancia entre los resultados cualitativos obtenidos por los diferentes métodos se analizó utilizando el índice  $\kappa$ . Las diferencias entre los distintos grupos de la enfermedad (actividad y nefritis) se evaluaron mediante análisis no paramétricos.

## RESULTADOS

En la tabla I se resumen los estudios de concordancia utilizando resultados cualitativos (positivo/negativo). Hubo una concordancia significativa, aunque baja, entre los anticuerpos contra los nucleosomas y los anticuerpos contra los componentes de los nucleosomas (histonas y dsDNA) medidos mediante ELISA. Sin embargo, no se obtuvo una concordancia significativa entre los anticuerpos contra los nucleosomas y la inmunofluorescencia en *Crithidia luciliae*.

En la tabla II se presentan los resultados de los tres autoanticuerpos medidos por los diferentes métodos en los pacientes con LES. Los anticuerpos contra los nucleosomas son los que tuvieron el mayor porcentaje de valores positivos, seguidos por los anticuerpos contra el dsDNA medidos mediante ELISA.

En la tabla III se presentan los resultados de los tres autoanticuerpos medidos en los pacientes con y sin nefritis. De los 20 pacientes con nefritis lúpica, 12 (60%) tuvieron anticuerpos contra los nucleosomas positivos. El mismo valor, 12 de 20

**Tabla I.** Concordancia entre los resultados cualitativos de los anticuerpos contra los nucleosomas y los anticuerpos contra los componentes de los nucleosomas (histonas y dsDNA).  $\kappa$ : Índice de concordancia entre los anticuerpos contra los nucleosomas y los otros anticuerpos.  $p$ : Nivel de significación de la concordancia.

	Histonas	dsDNA (Gull)	dsDNA (Gull)	dsDNA (Varelisa)	dsDNA (Varelisa)	dsDNA (CLIFT)
Valor discriminante		$\geq 30$ U/mL	$\geq 50$ U/mL	$\geq 35$ U/mL	$\geq 55$ U/mL	$\geq 1:10$
$\kappa$	0,352	0,563	0,395	0,510	0,542	0,103
$p$	0,007	<0,001	0,004	0,002	<0,001	0,141

**Tabla II.** Valores positivos de los autoanticuerpos en los pacientes con LES (n=40).

Anticuerpos contra	Valor discriminante	Positivos (n=40)	%
nucleosomas		24	60%
histonas		12	30%
dsDNA (Gull)	$\geq 30$ U/mL	17	42%
dsDNA (Gull)	$\geq 50$ U/mL	13	32%
dsDNA (Varelisa)	$\geq 35$ U/mL	22	55%
dsDNA (Varelisa)	$\geq 55$ U/mL	16	40%
dsDNA (CLIF)	$\geq 1:10$	3	7%

**Tabla IV.** Valores positivos de los autoanticuerpos en los pacientes con enfermedad activa y sin actividad.

Anticuerpos contra	Valor discriminante	Enfermedad activa (n=22)	Enfermedad inactiva (n=18)
Nucleosomas		15 (68%)	9 (50%)
Histonas		10 (45%)	2 (11%)
dsDNA (Gull)	$\geq 30$ U/mL	12 (54%)	5 (28%)
dsDNA (Gull)	$\geq 50$ U/mL	11 (50%)	2 (11%)
dsDNA (Varelisa)	$\geq 35$ U/mL	16 (73%)	6 (33%)
dsDNA (Varelisa)	$\geq 55$ U/mL	12 (54%)	4 (22%)
dsDNA (CLIFT)	$\geq 1:10$	3 (14%)	0

**Tabla III.** Valores positivos de los autoanticuerpos en los pacientes con nefritis y sin nefritis.

Anticuerpos contra	Valor discriminante	Con nefritis (n=20)	Sin nefritis (n=20)
Nucleosomas		12 (60%)	12 (60%)
Histonas		5 (25%)	7 (35%)
dsDNA (Gull)	$\geq 30$ U/mL	7 (35%)	10 (50%)
dsDNA (Gull)	$\geq 50$ U/mL	5 (25%)	8 (40%)
dsDNA (Varelisa)	$\geq 35$ U/mL	9 (45%)	13 (65%)
dsDNA (Varelisa)	$\geq 55$ U/mL	6 (30%)	10 (50%)
dsDNA (CLIFT)	$\geq 1:10$	1 (5%)	2 (10%)

(60%) se obtuvo en el grupo de pacientes sin nefropatía lúpica. Para los anticuerpos contra el dsDNA y la inmunofluorescencia en *Crithidia luciliae* se obtuvieron valores más bajos. No existen diferencias significativas de los tres autoanticuerpos entre los pacientes con y sin nefritis.

Con relación a la actividad de la enfermedad, en la tabla IV se presentan los resultados obtenidos para los tres autoanticuerpos. Existió una asociación significativa entre la enfermedad activa y los anticuerpos contra el dsDNA medidos mediante ambos ELISA (Gull con un valor discriminante de 50,  $p=0,016$  y Varelisa con un valor discriminante de 35,  $p=0,018$ ). No existió asociación con los anticuerpos contra los nucleosomas.

## DISCUSIÓN

La determinación de autoanticuerpos es un dato importante para el diagnóstico y, en ocasiones, para el seguimiento de las enfermedades autoinmunitarias. En alguna de estas enfermedades sistémicas, la presencia de determinados autoanticuerpos en el plasma sanguíneo es uno de los criterios diagnósticos. En el LES, la detección de anticuerpos contra el dsDNA es uno de los once criterios diagnósticos del Colegio Americano de Reumatología (CAR) (5). Por este motivo, la determinación de los anticuerpos contra el dsDNA es una

herramienta fundamental para el diagnóstico del LES; asimismo, esta medida es importante para el seguimiento de la enfermedad. En los últimos años se ha señalado que los anticuerpos contra los nucleosomas son un marcador más sensible para el LES que cualquier otro antígeno nuclear (7,13,14). También se ha señalado que los anticuerpos contra los nucleosomas pueden detectar a los enfermos con nefritis lúpica (9-11).

Hemos medido los anticuerpos contra los nucleosomas, así como los anticuerpos dirigidos frente a sus componentes individuales, histonas y dsDNA, en un grupo de pacientes con LES, valorando también la actividad de la enfermedad mediante un índice validado internacionalmente como es el SLEDAI y también se ha analizado la presencia de nefritis lúpica. Nuestros resultados indican que hay una concordancia entre los anticuerpos contra los nucleosomas y los anticuerpos contra las histonas y contra el dsDNA, medidos mediante ELISA (tabla I). La concordancia ha sido mejor para el dsDNA que para las histonas, lo cual puede señalar que el dsDNA es la diana principal de los anticuerpos contra los nucleosomas en el LES, más que las histonas.

La ausencia de concordancia entre los anticuerpos contra los nucleosomas y los anticuerpos contra el dsDNA medidos mediante CLIF puede deberse a la mayor avidez de los anticuerpos que se detectan mediante la inmunofluorescencia en *Crithidia luciliae*.

Los anticuerpos contra los nucleosomas fueron positivos en el 60% de los pacientes con LES, el mayor porcentaje de los anticuerpos medidos y un valor similar al de otros estudios (8,9), demostrando que son un marcador sensible de LES, aunque no han existido diferencias significativas entre los enfermos con nefropatía y sin nefropatía, resultado análogo al de otros autores (12). Asimismo, tampoco hay diferencias significativas de los anticuerpos contra los nucleosomas entre los pacientes con la enfermedad activa e inactiva (tabla IV), de acuerdo con lo obtenido por otros autores (8), aunque algunos estudios sí la han observado (9), especialmente utilizando

resultados cuantitativos obtenidos mediante ELISA y en series mayores de pacientes. El porcentaje de anticuerpos contra los nucleosomas en el lupus inactivo es mayor que el porcentaje de los anticuerpos contra el dsDNA (tabla IV), por lo que aunque los anticuerpos contra los nucleosomas son un marcador sensible en los pacientes con LES y están en mayor número de pacientes con LES activo, en nuestra serie no son un marcador de la actividad de la enfermedad tan bueno como los anticuerpos contra el dsDNA medidos cuantitativamente y con un valor discriminante adecuado.

Los porcentajes de pacientes con anticuerpos positivos contra el dsDNA obtenidos en nuestro estudio son inferiores a los obtenidos en otros estudios. En este sentido, debe indicarse que el estudio se ha realizado en enfermos con LES en tratamiento. Está demostrado que los tratamientos inmunodepresores hacen disminuir el título de anticuerpos contra el dsDNA (15).

Como conclusión podemos señalar que los anticuerpos contra los nucleosomas en el LES poseen una mayor prevalencia que los anticuerpos contra el dsDNA. Sin embargo, hay pacientes que presentan anticuerpos contra los nucleosomas positivos y anticuerpos contra el dsDNA negativos y a la inversa. Por este motivo, pensamos que en el momento actual aún deben medirse ambos anticuerpos y deben realizarse más estudios si se quieren sustituir los anticuerpos contra el dsDNA por los anticuerpos contra los nucleosomas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con una ayuda para proyectos de investigación de la Junta de Castilla y León (SA074/01).

Correspondencia:  
José Manuel González-Buitrago  
Servicio de Bioquímica  
Hospital Universitario de Salamanca.  
Fax: 923 291211.  
E-mail: buitrago@gugu.usal.es

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arents G, Burlingame RW, Wang B-C, Love WE, Mondrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10148-52.
2. Tax EJ, Kramers C, van Bruggen MC, *et al.* Apoptosis, nucleosomes and nephritis in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 1995; 48: 666-73.
3. Flora PK, Gregory CD. Recognition of apoptotic cells by human macrophages: inhibition by a monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2625-32.
4. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33: 167-240.
5. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
6. Burlingame RW, Rubin RL, Balderas RS, Theofilopoulos AN. Genesis and evolution of antichromatin antibodies in murine lupus implicates T-dependent immunization with self-antigen. *J Clin Invest* 1993; 91: 1687-96.
7. Chabre H, Amoura Z, Piette J-C, Godeau P, Bach J-F, Koutouzov S. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1485-91.
8. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, *et al.* Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases. Antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 76-84.
9. Bruns A, Blass S, Hausdorf G, Burmester G, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2307-15.
10. Cervera R, Viñas O, Ramos-Casal M, *et al.* Antichromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy. *Lupus* 2001; 10 (Supp 1): S75.
11. Kiss E, Lakos G, Németh J, *et al.* Anti-chromatin autoantibodies in a subset of hungarian lupus patients. *Lupus* 2001; 10 (Supp 1): S75.
12. Morozzi G, De Pitá O, Belliasi F, *et al.* Prevalence of anti-nucleosome autoantibodies in systemic and discoid lupus patients. *Lupus* 2001; 10 (Supp 1): S75.
13. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, *et al.* Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630-40.
14. Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994; 94: 184-92.
15. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998; 338: 1359-68.