

Inducción experimental de factores reumatoides de baja afinidad y reactividad cruzada con nucleoproteínas no histonas mediante anti-idiotipos dirigidos a factores reumatoides de alta afinidad y reactividad cruzada con histonas H1 y H2b

ALEJANDRO RUIZ-ARGÜELLES*

El análisis de la reactividad cruzada de factores reumatoides contra antígenos nucleares ha demostrado diferencias entre pacientes con artritis reumatoide y sujetos sanos seropositivos. Este trabajo demuestra que en artritis reumatoide, pero no en sujetos sanos, existe una subpoblación de moléculas que además de compartir un idiotipo público, muestran alta afinidad por IgG y reactividad cruzada contra histonas. Se demostró además que, en un modelo experimental, los factores reumatoides con las características mencionadas pueden inducir factores heterógenos, con baja afinidad por IgG y reactividad contra nucleoproteínas no-histonas, muy probablemente a través de circuitos anti-idiotípicos. El mecanismo podría explicar la diversificación serológica que existe en la artritis reumatoide.

CLAVES: Factor reumatoide, circuitos anti-idiotípicos, idiotipos públicos, genes de línea germinal.

SUMMARY

The study of the anti-nuclear cross reactivity of rheumatoid factors has shown differences between patients with rheumatoid arthritis and healthy seropositive subjects. This paper describes the finding, of a subpopulation of rheumatoid factor molecules which show a cross reactive idotype and show high affinity for IgG and cross reactivity against histones in rheumatoid arthritis patients but not in healthy subjects. These molecules, in turn, were able to induce, experimentally, heterogeneous rheumatoid factor molecules that show a low affinity for IgG and cross-reactivity against nucleoproteins other than histones, most likely through idiotypic networks. The mechanism could be responsible for the diversification of serum autoantibodies found in rheumatoid arthritis.

KEY WORDS: Rheumatoid factor, anti-idiotypic circuits, public idiotypes, germline genes.

Trabajo de ingreso presentado en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el 13 de julio de 1988.

* Académico numerario. Departamento de Inmunología. Laboratorios Clínicos de Puebla.

Numerosos estudios han demostrado la presencia de idiotipos de fracción cruzada -públicos- en factores reumatoides (FR) humanos, indicando conservación de los genes de la región V de la línea germinal que codifican para estos anticuerpos.^{1,4} Sin embargo, la demostración de idiotipos privados en moléculas de factor reumatoide dentro de un mismo individuo, sugiere que la recombinación y/o mutación somática contribuye en forma importante a enriquecer la diversidad de los factores reumatoides.⁵ De esta manera, las moléculas de FR en un individuo dado son una mezcla de anticuerpos homogéneos, conservados, compartidos con otros individuos, y anticuerpos heterogéneos, absolutamente privados.

En un trabajo previo se analizó el grado de conservación de las moléculas de FR estudiando la reactividad cruzada que algunos de estos anticuerpos exhiben frente a nucleoproteínas. Se observó que una subpoblación de moléculas de FR, con gran afinidad por IgG y reactividad cruzada contra histonas H1 y H2B, parece representar los productos de genes de línea germinal altamente conservados ya que, además de ser compartidos por múltiples individuos, presentan cierto grado de restricción isotípica y exhiben puntos isoeléctricos prácticamente constantes. Moléculas con estas características se encuentran en el suero, tanto de pacientes con artritis reumatoide clásica, como en el de sujetos ancianos seropositivos pero sin artritis reumatoide (AR). Por otra parte, el mismo estudio demostró la presencia de FR con reactividad heterogénea hacia nucleoproteínas no-histonas, con baja afinidad por IgG y polimorfismo de puntos isoeléctricos en el suero de pacientes con AR, pero no en el de ancianos sanos. Con base en estos hallazgos se propuso que en AR los FR conservados, de alta afinidad (Ac1), podrían inducir la producción de anticuerpos anti-idiotipo (Ac2) y, éstos a su vez, la de anti-anti-idiotipos (Ac3) que exhibirían la misma especificidad del idiotipo, i.e. actividad de factor reumatoide, pero menor afinidad. Estos anticuerpos (Ac3), estarían representados por los FR heterogéneos con reactividad contra nucleoproteínas no-histonas existentes en los sujetos con AR pero no en los sanos. En éstos, el mecanismo no operaría por: a) diferencias en la magnitud del estímulo; b) eficiencia de los mecanismos inmunoregulatorios, o c) diferencias en la estructura isotípica de los FR conservados en la salud y la enfermedad.

La investigación presente demuestra un idiotipo público de FR en un número importante de pacientes con AR, que no presentan los sujetos sanos, así como la capacidad de los anticuerpos portadores de dicho idiotipo para inducir, experimentalmente, anti-anti-idioti-

pos con baja afinidad por IgG y reactividad cruzada contra nucleoproteínas no-histonas.

Material y métodos

Sujetos. Se analizaron muestras serológicas de 72 pacientes con AR clásica o definida, 22 ancianos (>60 años) seropositivos, sin evidencia clínica de AR, 35 sujetos con otros padecimientos autoinmunes sin actividad de FR detectable en el suero y 25 sujetos sanos, sin actividad de FR.

Animales. Para la producción de anticuerpos anti-idiotipo se emplearon conejos de la raza gigante de Nueva Zelanda de seis meses de edad y 4300 g. de peso. Para la inducción experimental de anti-anti-idiotipos se emplearon ratones hembra BALB/c de dos meses de edad y 28 a 30 g. de peso. Todos se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio.

Detección de factor reumatoide. Se realizó mediante el método de aglutinación de látex según Singer y Plotz.⁷

Purificación de un factor reumatoide monoclonal (FRMo). Se obtuvo del suero de un paciente con macroglobulinemia de Waldenstroem (R.O.) que tenía un componente M (IgM-Kapa) de 35 gr/l. El suero se dializó contra agua destilada hasta obtener la precipitación de las euglobulinas. Estas se resuspendieron en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a pH 7.0 y se analizaron por cromatografía de exclusión en columnas (26 x 900 mm) de baja presión, cargadas con AcA 22 (LKB Bromma lote 2204-220). La fracción correspondiente a la macroglobulina fue recromatografiada en columnas (16 x 200) inmunoabsorbentes, cargadas con IgG de conejo conjugada a esferas de agarosa activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia lote NE 03979).⁸ El material captado por la columna fue lavado con PBS a pH 2, su título de FR fue de 1:640,000 y su naturaleza monoclonal fue confirmada por electroforesis convencional en poliacetato de celulosa. Para estudios posteriores se redujeron muestras de este FR con 2-mercaptoetanol⁹ y las cadenas ligeras y pesadas se aislaron por cromatografía de ultrafiltración de alta resolución en columnas TSK G 3000 SW (LKB 2135-830) en un sistema Ultrachrom Gti (LKB Series: controlador HPLC 2152, bomba 2150, colector de fracciones 2212, registrador 2158, impresora 2240).¹⁰ Previamente se había establecido que este FRMo mostraba alta afinidad por IgG y reactividad cruzada contra histonas H2B y H1, por lo que se consideró representativo de las moléculas conservadas del sistema de FR.

Producción de anticuerpos anti-idiotipo (anti-factor reumatoide). El FRMO purificado del paciente RQ fue inoculado en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea en 2 conejas. Con intervalos de una semana se hicieron tres inóculos más en adyuvante incompleto de Freund por la misma vía y, finalmente, el FRMO en solución salina se aplicó por vía endovenosa a través de la vena marginal de la oreja. Dos semanas después del último inóculo los animales se sangraron por punción cardiaca y el suero se colectó por centrifugación. Este fue adsorbido en dos ocasiones con muestras de una mezcla de suero insolubilizado de 10 sujetos sanos, sin FR, y en tres ocasiones más con cada una de las tres muestras de suero insolubilizado de pacientes con macroglobulinemia de Waldeström, sin actividad de FR. La fracción IgG del suero adsorto fue enriquecida por precipitación con sulfato de amonio y purificada por cromatografía de baja presión en columnas cargadas con dietilaminoetil celulosa, desarrollada en gradiente continuo de fofatos y pH.¹⁰ Se prepararon fragmentos F(ab)₂ por digestión con tripsina⁹ que se purificaron por cromatografía de ultrafiltración de alta resolución. En lo sucesivo este material se denominará anti-IdRQ por las iniciales del paciente de quien se purificó el FRMO con el que se indujo su producción.

Se prepararon fragmentos F(ab)₂ de IgG de conejos no inmunizados para emplearse como control en algunos experimentos (*vide infra*).

Detección inmunoenzimática del IdRQ en muestras de suero. Se emplearon fragmentos F(ab)₂ anti-IdRQ y fragmentos F(ab)₂ de control para revestir placas de microtitulación para análisis inmunoenzimático (Nunc, Dinamarca) por adsorción física en pH alcalino. Las muestras de suero de todos los sujetos se diluyeron 1:200 en PBS adicionado de Tween y se colocaron por duplicado en las placas. Después de dos hs de incubación se lavó el material no unido repetidamente para luego adicionar un anticuerpo de chivo anti-humano conjugado con peroxidasa (Sigma 25F-8864) y su unión se puso en evidencia con peróxido de urea y ortofenilendinmina. La intensidad del color desarrollado en cada pozo se registró como unidades de densidad óptica (D.O.) a 492 nm en un espectrofotómetro Zeiss (Serie No. 704DO56). Se consideraron positivas las muestras cuya D.O. fue superior a dos desviaciones estándar por arriba de la media obtenida en el estudio de las veinticinco muestras de sujetos sanos sin FR. El inmunoenálisis enzimático de las cadenas ligeras y pesadas del FRMO inductor del anti-Id demostró que la determinante IdRQ se encuentra en las cadenas Kapa exclusivamente.

Detección nefelométrica del IdRQ en muestras de suero. Se llevó a cabo en las mismas muestras analizadas por inmunoenálisis enzimático (IAE), esta vez diluidas en solución salina y mezcladas (10:1 V/V) con una dilución 1:10 del anticuerpo anti-IdRQ. La dispersión se registró en un nefelómetro de rayo laser Behring (Marburg, Alemania Occidental, Serie No. 19471/678) antes y después de incubación de las mezclas durante una hora a temperatura ambiente. Arbitrariamente, se consideraron como positivas las muestras con incremento igual o mayor a una unidad de voltaje en la lectura final con respecto a la basal.

Análisis por inmunoelectrotransferencia de la reactividad antinuclear de los FR. Como sustrato antigénico se usó un extracto nuclear hidrosoluble obtenido de eritrocitos de pollo White Leghorn. Este material fue sujeto a electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sodio, seguida de transferencia, mediante electroforesis anódica, a membranas de nitrocelulosa. Las áreas insaturadas de los nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche descremada de vaca antes de colocar tiras de 0.5 cm de ancho en contacto con los sueros de estudio. La captación de anticuerpos sobre las diversas fracciones del extracto nuclear se evidenció mediante el empleo de un sistema anti-inmuglobulina humana biotinilada, avidina/peroxidasa y diamino-bencidina. El efecto del reactivo anti-IdRQ sobre la reactividad antinuclear de los Fr se estudió preincubando muestras de pacientes con AR, diluidas de acuerdo a su título de FR, con cantidades excesivas (500 μ /ml) del anticuerpo anti-Id antes de llevar a cabo la inmunoelectrotransferencia.

Purificación de FR de alta y baja afinidad por IgG. Se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando gamaglobulina leporina acoplada a sepharosa y sueros de pacientes con AR. La cromatografía se desarrolló empleando un gradiente lineal de pH de 7.4 a 1.0 para eluir progresivamente las moléculas de Fr con afinidad creciente por IgG. Mediante este sistema se obtiene un primer pico, llamado FR de baja afinidad (FR-RA), levigado en un rango amplio de pH 6.5 a 3.8, y un segundo componente, llamado FR de alta afinidad (FR-AA), de base muy estrecha y mayor altura, levigado cuando el pH del sistema alcanza 2.5 (Figura 1). Las fracciones fueron recibidas en tubos de amortiguador concentrado (PBS pH 7.4, 10X) para neutralizarlas antes de analizarse para la presencia de IdRQ por IAE.

Inducción experimental de anticuerpos anti-anti-idiotipo. El FRMO del paciente RQ purificado, se inyectó por vía intraperitoneal (2mg en sol. salina) en diez ratones hembra por cuatro ocasiones con intervalos de

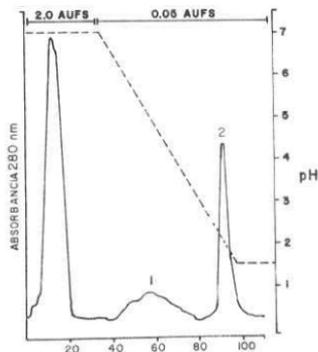


Figura 1.

una semana. Diez días después del último inóculo, los ratones fueron sangrados por punción retrororbitaria y el suero separado por centrifugación. Como controles se inocularon, bajo el mismo esquema, cinco ratones iguales con una paraproteína IgM-Kapa de otro paciente con macroglobulinemia de Waldenstroem pero sin actividad de factor reumatoide. El suero obtenido de cada uno de los quince ratones fue inoculado a su vez en quince animales isogénicos, también por vía intraperitoneal, aplicando tres inyecciones de 0.2 ml cada una con intervalo de dos semanas. Diez días después del último inóculo los animales fueron sangrados y en el suero se investigó factor reumatoide y reactividad cruzada contra nucleoproteínas por inmoelectrotransferencia. En dos muestras seleccionados del grupo que recibió el anti-IdRQ, se investigó la afinidad de los factores reumatoides por IgG leporina mediante cromatografía de afinidad.

Resultados

Detección del IdRQ. La figura 2 muestra la lectura de la densidad óptica registrada para cada una de las muestras analizadas por IAE. El 43 por ciento de las muestras provenientes de pacientes con AR mostraron reactividad con el anti-IdRQ, en tanto que ninguna de las muestras de ancianos seropositivos o de pacientes con enfermedades autoinmunes diversas, presentaron captación al reactivo anti-IdRQ. No hubo captación de

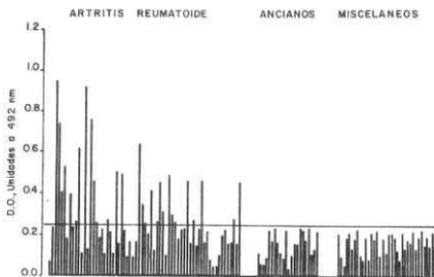


Figura 2.

inmunoglobulinas de ninguno de los sueros estudiados en las placas revestidas con fragmentos F(ab')₂ de IgG de conejas no inmunizadas (control).

La nefelometría de rayo laser demostró reactividad con el anti-IdRQ en el 17 por ciento de las muestras de pacientes con AR, todas ellas positivas por IAE. No se detectaron reacciones positivas por nefelometría en muestras de ancianos seropositivos, sujetos voluntarios sanos ni del grupo miscelaneo. Los resultados sugieren que la nefelometría fue menos sensible para detectar la reactividad del anti-IdRQ con los FR de pacientes con AR ya que, además, coincidieron las muestras con resultados positivos por nefelometría con las que tenían lecturas más altas en el IAE.

Demostración del IdRQ en FR de alta afinidad. Las muestras de cinco pacientes con AR en las que se detectó de IdRQ se fraccionaron por afinidad. Después de ajustar la concentración de proteínas en todas las fracciones a 10 µg/ml y analizarlas por IAE, se demostró reacción intensa de las fracciones de FR-AA de las cinco muestras con el anti-IdRQ en tanto que las fracciones correspondientes a los FR-BA de las mismas muestras no lo hicieron por arriba del límite previamente definido como normal (Figura 3).

Bloqueo de la reactividad anti-histonas de FR por el anti-IdRQ. Este análisis se practicó en nueve muestras de pacientes con AR, en las que se detectó el IdRQ y cuya reactividad anti-histonas se había demostrado con anterioridad. En todas ellas, la preincubación durante dos horas con el reactivo anti-IdRQ fue suficiente para bloquear la reactividad cruzada contra las histonas H1 y H2b (Figura 4). Por el contrario, la reactividad contra

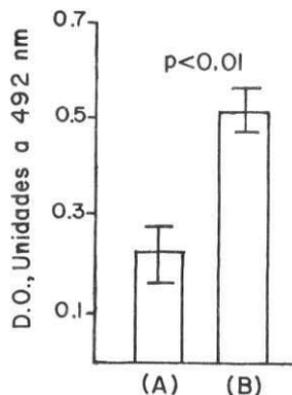


Figura 3.



Figura 4.

otros antígenos nucleares, de la que parecen ser responsables los FR-RA,⁶ no se vió afectada por el pretratamiento con el anticuerpo anti-IdRQ.

Estos datos sugieren que el Id contra el que reacciona el anticuerpo anti-IdRQ se encuentra restringido a una subpoblación de moléculas con FR que tiene gran afinidad por IgG y reactividad cruzada contra las histonas H1 y H2b.

Actividad y características de FR en animales inmunizados con anti-IdRQ isogénicos. Nueve de los diez animales que recibieron el suero de los diez animales inoculados con el FR humano IdRQ+ mostraron actividad de FR sérico a títulos variables entre 1:2 y 1:16. En ninguno de los cinco que recibieron el suero de los cinco ratones inoculados con la paraproteína control (FR-) se detectó actividad de FR. El análisis por inmunoelectrotransferencia de los nueve sueros positivos con actividad de factor reumatoide demostró, en todos ellos, reactividad cruzada contra nucleoproteínas no histonas, con pesos moleculares entre 53 y 63 Kd, que podrían corresponder con el antígeno Ro, el antígeno laminar nuclear, el antígeno Mi-2, el doblete Sm o el antígeno La¹¹⁻¹⁴ (Figura 5). Cuando las muestras correspondientes a los dos animales con los títulos más altos de FR se fraccionaron en las columnas inmunoabsorbentes, todo el material captado por el complejo IgG-agarosa eluyó en un rango de pH de 4.5 a 6, indicando su baja afinidad por inmunoglobulina G.5

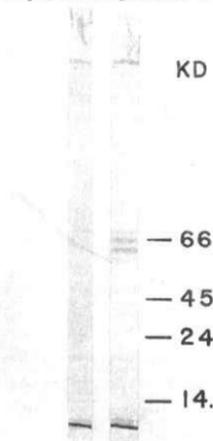


Figura 5.

Discusión

En una comunicación previa,⁶ se propuso la existencia de una subpoblación de moléculas de FR que muestra tener alta afinidad por la IgG y reactividad cruzada con histonas H1 y H2b. Su amplia distribución y lo restringido de su punto isoeléctrico⁶ parecen indicar que están

codificadas por genes de línea germinal altamente conservados en la especie. En dicho estudio se detectaron moléculas de factores reumatoideos con las características descritas tanto en muestras obtenidas de pacientes con AR, como ancianos sin AR, por lo que se postuló que los genes de línea germinal que las codifican se podrían activar tanto en la salud como en la enfermedad. El hallazgo de FR de baja afinidad por IgG y reactividad cruzada contra nucleoproteínas no-histonas en pacientes con AR, pero no en ancianos sanos, condujo a proponer que tal vez estos FR podrían representar anticuerpos anti-anti-idiotipos de los factores reumatoideos conservados, siendo uno de los posibles mecanismos para explicar la diferencia de lo que ocurre en AR y en sujetos ancianos que hubiese diferencias en la estructura idiotípica de los FR conservados de pacientes con AR y sin ella. En apoyo de esta posibilidad, en el presente trabajo se observó que los FR de alta afinidad y reactividad anti H1 y H2b de una importante proporción de pacientes con AR muestran un Id público, al que se denominó IdRQ, que está ausente en los factores reumatoideos de ancianos sanos. Asimismo, se pudo comprobar que al menos un FR monoclonal, portador del Id mencionado y por ende representativo de los FR conservados en pacientes con AR, fue capaz de inducir la producción, experimental, de FR de baja afinidad por IgG y reactividad cruzada con nucleoproteínas no-histonas, muy probablemente a través de circuitos anti-idiotípicos.

Se han descrito un gran número de idiotipos de reacción cruzada -públicos- en FR humanos,^{1-4,15,16} muchos de los cuales se han podido ubicar en la cadena ligera K α ,^{1,15,16} particularmente en el isotipo K III b.¹⁶ La secuencia aminoacídica de algunos de estos Id públicos de los FR ya ha sido establecida¹⁷ y algunos han sido exitosamente clonados.¹⁸ Sin embargo, el papel patogénico que juegan los anticuerpos portadores de dichos Id, y/o los genes de línea germinal que los codifican, permanece aún en controversia dado que son comparados tanto por autoanticuerpos "naturales" como por autoanticuerpos "patogénicos".¹⁹

El Id de reacción cruzada que se describe en este estudio, bien podría corresponder con alguno de los informados antes. De hecho, Agnello y col² describieron un Id público en FR monoclonales que presentaban reactividad cruzada con histona H2b, que es una de las características del subgrupo de FR en que esta presente el IdRQ. Sin embargo no se tiene conocimiento de que el Id descrito por Agnello, u otros Id públicos de factores reumatoideos humanos, se haya investigado en FR de sujetos sanos.

La presencia del IdRQ en moléculas de FR de una amplia proporción de pacientes con AR y su ausencia en FR de ancianos sanos, puede tener varias explicaciones:

- 1) Las células precursoras que contienen los genes de línea germinal que codifican el IdRQ están presentes en pacientes con AR pero no en personas sanas.
- 2) Las células precursoras que contienen los genes que codifican IdRQ están presentes tanto en pacientes con AR como en personas sanas, pero en el segundo grupo la expresión de estos genes estaría inhibida por afecto de células supresoras o de anticuerpos anti-idiotípicos.
- 3) Los precursores existen tanto en el repertorio de pacientes con AR como en el de personas sanas, pero sólo en los pacientes con AR la reactividad cruzada desencadenada por otro antígeno, endógeno o exógeno, puede iniciar la activación de este clonotipo particular.
- 4) El FR IdRQ+ no es un anticuerpo "patogénico" *per se*, sino simplemente un marcador genético de proclividad a padecer AR; se contemplan de manera similar ciertos antígenos HLA-DR asociados a este padecimiento. La ausencia del IdRQ en más de ochenta muestras de individuos sin AR hace de esta posibilidad la más débil.

La investigación de células precursoras IdRQ+ en pacientes con AR y sus familiares, así como en sujetos sanos con o sin actividad detectable de FR, puede aportar información valiosa sobre el papel que desempeñan los genes de línea germinal que codifican estos idiotipos en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes.

El modelo experimental para inducir anticuerpos anti-anti-Id de un factor reumatoide monoclonal IdRQ+, merece algunas consideraciones: A) Los animales receptores de las paraproteínas humanas pudieron haber producido anticuerpos anti-isotípicos y anti-alotípicos, amén de anticuerpos anti-idiotípicos. Los primeros no pudieron ser responsables de la diferencia observada entre el grupo experimental y el control pues ambos recibieron los mismos isotipos de cadenas ligeras y pesadas. Aunque parece poco probable que los anticuerpos anti-alotípicos fueran inductores de factores reumatoideos en el grupo experimental y no en el grupo control, no es posible descartar en forma absoluta esta alternativa. B) Los animales receptores del FR IdRQ+, debieron haber desarrollado más de un tipo de anticuerpos anti-Id y no solamente anti-IdRQ, y ser los primeros, más que los últimos, los capaces de inducir FR (anti-anti-Id) en los ratones isogénicos en que se

inocularon. De hecho, es probable que los anti-IdRQ no sean "imágenes antiernos" del FRMO IdRQ+ dado que la gran mayoría de Id públicos se encuentran en las regiones de armazón y, por ende, estos anticuerpos, muy probablemente anti-idiotopes, no podrían inducir anticuerpos anti-Id con actividad de FR.²⁰ C) A pesar de las limitaciones del modelo, éste probó ser útil para demostrar que al menos un FR representativo, de los codificados por genes de línea germinal y portador de un Id restringido a la AR, es capaz de inducir la producción de FR de baja afinidad, que muy probablemente corresponden a sus anti-anti-Id.²⁰

La posibilidad de que mecanismos como el propuesto operen en otras enfermedades autoinmunes y contribuyan así a la diversificación serológica y, quizás, a la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de dichos padecimientos, amerita ser investigada.

Agradecimientos

Al doctor José Miguel Presno Bernal por su colaboración en el desarrollo de los experimentos incluidos en este trabajo; a la licenciada en biología Matilde Vallis por sus críticas y sugerencias en la elaboración del manuscrito y a la señorita Lilia Téllez Lobato por su colaboración secretarial.

Referencias

1. Pasquali JL, Fong S, Tsoukas C, Vaughan JH, Corson DA. Inheritance of immunoglobulin M rheumatoid-factor idiotypes. *J Clin Invest* 1980; 66: 863.
2. Agnello V, Arbetter A, Ibañez-de-Kasp G, Powell R, Tan EM, Joslin F. Evidence for a subset of rheumatoid factors that cross-react with DNA-histone and have a distinct cross-Idio-type. *J Exp Med* 1980; 151: 1514.
3. Takeuchi T, Hosono O, Koide J, Homma M, Abe T. Suppression of rheumatoid factor synthesis by anti-idiotypic antibody in rheumatoid arthritis patients with cross-reactive idiotypes. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 873.
4. Posnett DN, Wisniewski R, Pernis B, Kunkel HG. Dissection of the human anti-gammaglobulin idiotype system with monoclonal antibodies. *Scand J Immunol* 1986; 23: 169.
5. Nelson JL, Nardella FA, Oppiger IR, Mannik M. Rheumatoid factors from patients with rheumatoid arthritis possess private repertoires of idiotypes. *J Immunol* 1987; 138: 1391.
6. Ruiz-Argüelles A, Presno-Bernal M, Deschamps E. Identification of rheumatoid factor subsets with different anti-nuclear cross-reactivity by immunoblotting. *Clin Immunol Newlet*. (En prensa).
7. Singer JM, Plotz CM. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1956; 21: 888.
8. Mannik M, Stage DE. Antibody-agarose immunoadsorbents: complete removal of classes of immunoglobulins from serum. *J Immunol* 1971; 106: 1670.
9. Stanworth DR, Turner MW. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits. *Handbook of Experimental Immunology*, 3th ed. London: DM Wier, Blackwell Scientific Publications, 1978; 6: 1.
10. Fahey JL, Terry EW. Ion exchange chromatography and gel filtration. *Handbook of Experimental Immunology*, 3th ed. London: DM Wier, Blackwell Scientific Publication, 1978; 8: 1.
11. Cristian CHL, Elkon KB. Autoantibodies to intracellular proteins. Clinical and biological significance. *Am J Med* 1986; 80: 53.
12. Kaplan JH, Rose NR. Recent developments in the isolation and use of nuclear antigens to identify and characterize autoantibodies associated with systemic rheumatic diseases. *Clin Immunol Newlet* 1986; 7: 161.
13. Stott DI. Autoantibodies to nuclear antigens. *Immunol Today* 1985; 6: 314.
14. Tan EM. Autoantibodies to nuclear proteins and ribonucleoprotein. *Acta Med Scand* 1987; 715: 99.
15. Kunkel HG, Winchester RJ, Jeslin FG, Capara JD. Similarities in the light chains of anti-gammaglobulins showing crossidiotypic specificities. *J Exp Med* 1974; 139: 128.
16. Pons-Estel B, Goni F, Solomon A, Frangione B. Sequence similarities among KIIb chains of monoclonal human IgMK autoantibodies. *J Exp Med* 1984; 160: 893.
17. Goni F, Chen PP, Pons-Estel B, Carson DA, Frangione B. Sequence similarities and cross idiotypic specificity of L chains among human monoclonal IgMK with anti-globulin activity. *J Immunol* 1985; 135: 4073.
18. Chen PP, Schwartz R, Carson DA. Genetic basis of three major cross-reactive idiotypes (CR) of human rheumatoid factor (RF). *Arthritis Rheum* 1986; 29: 539 (Abstr.).
19. Davidson A, Sefner R, Livneh A, Diamond B. The role of somatic mutation of immunoglobulin genes in autoimmunity. *Ann Rev Immunol* 1987; 5: 85.
20. Bona CO. Regulation of lymphocyte function by anti-idiotypic antibodies. Idiotypes and lymphocytes. Nueva York: Academic Press, 1981; 156.

COMENTARIO

DONATO ALARCON-SEGOVIA*

Es probable que ustedes se encuentren sorprendidos, por una parte por la alta calidad técnica y académica del trabajo que, proveniente de un laboratorio privado en la provincia mexicana, nos ha presentado el joven investigador Alejandro Ruiz Agüelles a su ingreso a la Academia y, por la otra, por las nociones en él vertidas de que los autoanticuerpos pueden estar codificados por genes que él llama de línea germinal. Más aún, que tales autoanticuerpos ocurran en sujetos normales al punto de que si no los tuvieran requeriría de tanta o más explicación que su presencia en pacientes.

La mesa directiva de la Academia me ha honrado esta noche pidiéndome que comente el trabajo del doctor Alejandro Ruiz Argüelles, y esto me da la oportunidad de decirles porqué yo no estoy sorprendido.

* Académico titular. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

La alcurnia científica a la que ha llegado Alejandro Ruiz Argüelles tiene bases tanto genéticas como adquiridas. Las genéticas se hacen evidentes en el hecho de que en la sesión de esta noche participan también su padre y su hermano, ambos académicos. Si Octavio Paz ha dicho que los latinoamericanos somos seres que habitamos en los suburbios de occidente, en las afueras de la historia, esto podría esperarse todavía más de nuestra provincia. A quienes visitamos el laboratorio de los doctores Ruiz en Puebla, nos es dado encontrar lo opuesto a esa noción en un enclave de excelencia casi único en México. Hasta aquí lo genético. De las adquiridas tengo el orgullo de haber sido partícipe ya que el doctor Alejandro Ruiz Argüelles se formó como inmunólogo en nuestro laboratorio del Instituto Nacional de la Nutrición y después amplió sus horizontes, en forma también por demás brillante, en la Clínica Mayo. Con nosotros, él participó como elemento primordial en el proyecto de penetración de anticuerpos a células vivas,¹ cuya importancia apenas está siendo reconocida por haberse adelantado a su tiempo y que, apenas diez años más tarde, ha sido plenamente confirmado por cuatro grupos diferentes en 1987.

Pero quiero ahora explicarles porqué no me sorprende la noción de que en el suero de sujetos sanos haya autoanticuerpos y, sobre todo, que éstos ocurran en sujetos de mayor edad. En 1968 propusimos que los anticuerpos antinucleares podrían ser anticuerpos naturales, es decir, que la tasa normal de inmunoglobulinas estuviera dada en parte por tales autoanticuerpos.² Esto se ha replanteado recientemente y Avrameas con su grupo del Instituto Pasteur lo han confirmado.³ Pero el trabajo de Alejandro Ruiz Argüelles va más allá, al encontrar diferencias substanciales entre los factores reumatoides de los pacientes con artritis reumatoide y los de sujetos sanos de edad avanzada. Los de los pacientes son de alta afinidad y tienen reacción cruzada con histonas. En cambio, los de los sujetos sanos son de baja afinidad y tienen reactividad cruzada con nucleoproteínas no histonas. Esto se podría considerar debido a diferencias en estímulos que sufren las células portadoras de los correspondientes genes de línea germinal en los trastornos de inmunorregulación de la artritis reumatoide y del anciano. En el caso de la artritis reumatoide esto podría ocurrir de acuerdo a la teoría de diseminación idiotípica de Bevrá Hahn, según la cual las células B que llevan la información genética para producir inmunoglobulina portadora de ciertos idiotipos públicos son selectivamente reguladas positivamente por células T cooperadoras capaces de reconocer los idiotipos.⁴ El hallazgo de Ruiz Argüelles de que los

anticuerpos anti-anti-idiotipo público, producidos en animales inoculados con el anti-idiotipo al factor reumatoide monoclonar que comparte idiotipo con los de la artritis reumatoide, se comportan como los factores reumatoides de los ancianos, con su baja finidad y su reactividad cruzada con nucleoproteínas no histonas, es extremadamente interesante y se presta a muchas interpretaciones en cuanto a su generación. Esta no podría considerarse como debida un gen de línea germinal sino como resultado de la estimulación antigénica por el idiotipo primero y el anti-idiotipo después, sea de la inmunoglobulina o, como lo han encontrado Coutinho y su grupo,⁵ de el receptor de antígeno de las células T. Podría ocurrir que el factor reumatoide con el idiotipo público estuviera enmascarado por el anti-idiotipo en el anciano y que lo que detecta Ruiz Argüelles sea ya solamente el anti-anti-idiotipo.

En fin, creo que el entusiasmo que me genera este trabajo, ver a Alejandro Ruiz Argüelles tan académico, y tener el gusto de recibirlo hoy en la corporación, me hacen correr el riesgo de aburrir a ustedes con mis disquisiciones de inmunoreumatólogo.

Muchas gracias.

Referencias

1. Alarcón-Segoriva D, Ruiz-Argüelles A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 1979; 271:69.
2. Alarcón-Segoriva D, Fishbein E. Variations in incidence of antinuclear factors to nine calf thymus nuclear antigens in normal human subjects. *Arthritis Rheum* 1968; 11: 462.
3. Diquero G, Lymberi P, Guilbert B, Ternynck T, Avrameas S. Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 475: 135.
4. Ebling FM, Ando DG, Panosian-Sahakian N, Kalunian KC, Hahn BH. Idiotypic spreading promotes the production of pathogenic autoantibodies. *J Autoimmun* 1988; 1: 47.
5. Martínez AC, Bragado R de la Hera A y col. Functional and biochemical evidence for the recognition of T cell receptors by monoclonal antibodies to an immunoglobulin idiotype. *J Mol Cell Immunol* 1986; 2: 307.