



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (AAN)
POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA, EN POBLACIÓN
MEXICANA SANA”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTADO POR:

P.Q.F.B. GUADALUPE GISSELA MARIN HERNANDEZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

MORELIA MICHOACÁN., AGOSTO DEL 2007.



DEDICATORIAS:

A mi padre.

Por su incondicional amor, por creer y confiar en mí siempre, por sembrar en mi grandes valores, por la gran sabiduría que hay en cada una de tus palabras, y porque te debo todo lo que soy.

A mi madre.

Por el gran amor, que me brinda día a día, porque nunca me has abandonado, por vivir la vida junto a mí siempre incluso en los momentos de gran adversidad, por ser el personaje de mayor admiración que tengo en la vida. Gracias Mamá por ver en mi, lo mejor que tengo.

A mis hermanos.

Raúl y Pamela, por darme su apoyo siempre que los necesito, por quererme tal y como soy, y por que han permanecido junto a mí, en los mejores y peores momentos de mi vida.

A mis amigos.

Brenda, Mildred, Claudia, Saila, e Ivette, las mejores amigas que tengo, por brindarme su apoyo y cariño en las situaciones difíciles, por no juzgarme. Porque hemos pasado los mejores momentos de diversión juntas y por la confianza que me han brindado en diversas ocasiones cada una de ella.

AGRADECIMIENTOS.

Con gran cariño y admiración a la **D.C. Martha Eva Viveros**, por sus enseñanzas, por la paciencia que siempre tuvo conmigo, por transmitirme su conocimiento, por su estímulo para que yo siga creciendo como profesionista y sobre todo por brindarme su amistad, lo que hizo que formáramos un gran equipo de trabajo.

Mi eterno agradecimiento:

Al **Dr. Mario Humberto Cardiel**, por su invaluable y generoso apoyo e interés por esta investigación. Por su colaboración en el análisis de resultados y discusión de este trabajo, así como su fundamental ayuda durante el reclutamiento de pacientes.

Al **Dr. Horacio Cornejo Ballesteros**, por las valiosas aportaciones que hizo a este trabajo, y su gran colaboración y ayuda en el reclutamiento de pacientes.

A la **Q.F.B. Bertha Ballesteros Silva** y a los laboratorios de análisis clínicos **CEDIMI**, por brindarnos las facilidades, y apoyo en sus instalaciones, durante la realización de este trabajo.

Al **Dr. José Alanis Ugarte** y **Q.F.B Angélica García Ruiz de Chávez**, por las correcciones y sugerencias que realizaron a este trabajo, durante la revisión del mismo.

INDICE

CONTENIDOS.

Dedicatorias.....	i	
Agradecimientos.....	ii	
Abreviaturas.....	ix	
Glosario.....	xii	
Capitulo		
1. Resumen.....	1	
	2	
2. Introducción.....	3	
3. Marco Teórico		
3.1 Inmunofluorescencia Indirecta.....	4	
3.1.1 Microscopio de Fluorescencia		
3.1.1 a Descripción.....	5	
3.1.1 b Funcionamiento.....	6	
3.1.2 Sustrato.....	7	
3.2 Patrones nucleolares.....	8	
	9	
	10	
	11	
	12	
	13	
3.3 Patrones del citoplasma.....	14	
3.4 Principales Anticuerpos Antinucleares.....	15	iii

	16	
	17	
	18	
	19	
	20	
3.5 Titulo de Anticuerpos Antinucleares.....	21	
	22	
3.6 Patologías relacionadas con la presencia de Anticuerpos Antinucleares		
3.6.1 Lupus Eritematoso Sistémico.....	24	
3.6.1.a Epidemiología.....	24	
3.6.1.b Patogenia.....	24	
3.6.1.c Fisiología Patológica.....	25	
	26	
3.6.1.d Manifestaciones Clínicas.....	26	
	27	
	28	
3.6.1.e Curso de la Enfermedad.....	28	
3.6.1.f Laboratorio.....	28	
	29	
3.6.1.g Diagnostico.....	30	
3.6.1.h Tratamiento.....	30	iv

3.6.2 Artritis Reumatoide.

3.6.2.a Definición.....	31
3.6.2.b Epidemiología.....	31
3.6.2.c Etiología.....	31
3.6.2.d Patología.....	31
	32
3.6.2.e Manifestaciones Clínicas.....	32
3.6.2.f Pronostico.....	32
	33
3.6.2.g Laboratorio.....	33
3.6.2.h Diagnostico.....	34
3.6.2.i Tratamiento.....	34
	35
3.6.3 Síndrome de Sjögren.	
3.6.3.a Definición.....	35
3.6.3.b Incidencia y Prevalencia.....	36
3.6.3.c Patogénesis.....	36
	37
3.6.3.d Laboratorio.....	37
3.6.3.e Tratamiento.....	37

3.6.4 Esclerosis Sistémica.	
3.6.4.a Definición.....	38
3.6.4.b Epidemiología.....	39
3.6.4.c Patogenia.....	39
	40
3.6.4.d Laboratorio.....	42
3.6.4.e Tratamiento.....	42
3.6.5 Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo.	
3.6.5.a Definición.....	43
3.6.5.b Epidemiología.....	43
3.6.5.c Manifestaciones Clínica.....	44
3.6.5.d Laboratorio.....	44
3.6.5.e Tratamiento.....	45
3.6.6 Dermatomiositis y Polimiositis.	
3.6.6.a Dermatomiositis.....	47
3.6.6.b Polimiositis.....	48
3.6.6.c Laboratorio en Dermatomiositis y Polimiositis.....	48
	49
3.6.6.d Tratamiento.....	50
4. Justificación.....	51

5. Objetivos	
5.1 Objetivo General.....	52
5.2 Objetivo Especifico.....	52
6. Material y Métodos.	
6.1 Población de estudio.....	53
6.2 Material Biológico.....	53
6.3 Metodología.....	54
	55
6.4 Análisis Estadístico.....	55
7. Resultados.....	56
	57
	58
	59
	60
	61
	62
	63
	64
	65

8. Discusión.....	66
	67
	68
	69
	70
	71
9. Conclusiones.....	72
10. Bibliografía.....	73
	74
	75
	76

ABREVIATURAS.

AAN	Anticuerpos Antinucleares.
ACA	Anticuerpos anticentromero.
ADNds	Ácido desoxirribonucleico doble cadena.
ADNss	Ácido desoxirribonucleico cadena simple.
AMA	Anticuerpos anti-mitocondriales
ASMA	Anticuerpos anti-músculo liso.
ARN	Ácido ribonucleico.
AR	Artritis Reumatoide.
BUN	Nitrógeno ureico en sangre.
C5b9	Complejo de ataque de membrana.
CAM	Moléculas de adhesión celular.
CCP	Antipeptidos citrulinados cíclicos.

CREST Forma de ESP con calcinosis importante, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica, esclerodactilia, telangectasias.

DEC-CE9 Anticuerpo anti CD4.

DM Dermatomiositis.

EAI Enfermedad autoinmune.

EGO Examen general de orina.

ELISA Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas.

EMTC Enfermedad Mixta del tejido conjuntivo.

ESP Esclerosis Sistémica Progresiva.

FNT Factor de necrosis tumoral.

HLA Antígeno leucocitario humano.

HEp-2 Células Epiteliodes Humanas HEp-2.

IFI Inmunofluorescencia Indirecta.

IL Interleucina. X

Jo-1	Histidil-ARNt sintetasa.
LES	Lupus Eritematoso Sistémico.
MEC	Matriz extracelular.
PCR	Proteína C Reactiva.
PM	Polimiositis.
RNP	Proteína asociada al ARN.
Sci-70	Antitipoisomerasa.
Sm	Proteína asociadas al ARN. (Antígeno Smith).
SRP	Ribonucleoproteina citoplasmática.
SS	Síndrome de Sjogren.
SSA/Ro	Ribonucleoproteina.
TTC	Trastornos del Tejido Conectivo.
VSG	Velocidad de sedimentación globular.

GLOSARIO.

Anafase.- Esta es la tercera fase de la mitosis. Las cromatides son divididas y dirigidas hacia los polos por el huso citoplasmático.

Antígeno.- Es una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido) de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos.

Apoptosis.- Es uno de los principales tipos de muerte celular programada (PCD). Como tal es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada.

Autoinmunidad.- Es la insuficiencia o pérdida de los mecanismos responsables de la tolerancia a lo propio, en que se desarrolla una respuesta inmune humoral o celular contra antígenos propios.

Calcicosis.- Deposito de sales de cal en nódulos en los tejidos.

Carcinoma.- Es una forma de cáncer con origen en células de estirpe epitelial o glándula de tipo maligno.

Centrómero.- Es la región de construcción primaria en los cromosomas humanos y es el sitio en donde las cromátides hermanas se unen durante la mitosis.

Cromosoma.- Es cada uno de los pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en que se organiza la cromatina del núcleo celular en la mitosis, cada uno de los cuales se divide longitudinalmente, dando origen a dos cadenas gemelas (iguales).

Enzimoimmunoanálisis.- Técnica que utiliza la reacción antígeno-anticuerpo para el análisis cualitativo y cuantitativo de diversas sustancias.

Esclerodactilia.- Escleroderma limitado a los dedos de la mano o del pie.

Inmunodifusion.- Prueba basada en la reacción dada al enfrentar un antígeno comercial y un suero problema que puede o no tener anticuerpos cierto antígeno. Esta reacción se lleva a cabo en un medio semisólido (Agar Purifield). La reacción entre los anticuerpos presentes en el suero problema y el antígeno, es una línea o banda de precipitina que se forma entre el antígeno y el suero problema si éste tiene títulos de anticuerpos.

Inmunoglobulinas.- Son proteínas anticuerpo altamente específicas que son producidas en respuesta a antígenos específicos. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son producidos por los linfocitos B en su forma unida a la membrana.

Inmunoprecipitación.- Es una técnica que utiliza los anticuerpos específicos a una proteína para quitar esas proteínas de la solución. Los complejos del anticuerpo-proteína se precipitan fuera de la solución con la adición de una forma insoluble de proteínas obligatorias del anticuerpo.

Interfase.-Es el estado en el que se encuentra la célula cuando no esta en el proceso de división. Durante este periodo la célula duplica su material genético, crece y prepara las estructuras y proteínas necesarias para llevar a cabo la mitosis.

Metafase.- Esta es la segunda fase de la mitosis. Durante esta fase los cromosomas se dirigen hacia el plano ecuatorial de la célula. Aparece el huso citoplasmático.

Miofilamentos.- Son fibras que conjuntas forman la miofibrilla. Están constituidos por proteínas y son de dos tipos: miofilamentos delgados formados por la proteína actina, y miofilamentos gruesos formados por la proteína miosina.

Nucleosoma.-Es una estructura que constituye la unidad fundamental y esencial de cromatina, que es la forma de organización del ADN en los eucariotes.

Radioinmunoanálisis.- Es una técnica inmunológica, que tiene una gran aplicación en clínica. Permite la cuantificación exacta de compuestos biológicos presentes en el organismo en concentraciones tan bajas como ng/ml o incluso de pg/ml. El radioinmunoanálisis se basa en una reacción antígeno-anticuerpo.

Telangiectasia.-Dilatación de los vasos capilares de pequeño calibre, generalizada o localizada; angioma simple.

Telofase.-Esta es la última fase de la mitosis. Llegan los cromosomas a los polos. Se forma una membrana nuclear alrededor de los cromosomas.

1. RESUMEN.

Los anticuerpos antinucleares (AAN), son inmunoglobulinas predominantemente IgG, dirigidas contra moléculas nucleares: DNA, RNA, proteínas nucleares, nucleolares y/o citoplásmicas, importantes para el diagnóstico de los trastornos del tejido conectivo (TTC), pero también presentes en algunos individuos sanos(a títulos bajos).

En el presente trabajo se propone establecer los valores de referencia de anticuerpos antinucleares en individuos sanos de la población Mestizo-Mexicana, que puedan ser de ayuda al médico para realizar el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo.

Comenzamos nuestro estudio, reuniendo las muestras de los 3 grupos incluidos en este trabajo: donadores de banco de sangre, personal de salud, y familiares de pacientes con enfermedad autoinme, proseguimos con el procesamiento de las muestras por la técnica de Inmumofluorescencia indirecta (IFI), utilizada para llevar a cabo dicha determinación.

Encontramos que puede considerarse positiva una prueba de anticuerpos antinucleares con patrón moteado grueso, solo si esta se presenta en una dilución mayor o igual 1:160. En títulos menores para el patrón moteado grueso la prueba se consideraría negativa.

1.1 SISTEMATIZACION.

En el presente trabajo, trataremos de definir que son anticuerpos antinucleares, cual es el papel que estos desempeñan, en pacientes con enfermedades difusas del tejido conectivo, así como el valor diagnostico de estos anticuerpos en este tipo de pacientes.

Hablaremos de la Inmunofluorescencia Indirecta con células HEP-2, y las ventajas que esta tiene sobre otras técnicas utilizadas para llevar a cabo la determinación de estos anticuerpos. Describiremos extensamente cada uno de los patrones de fluorescencia, además describiremos brevemente algunos patrones del citoplasma, citaremos y describiremos cada uno de los principales anticuerpos antinucleares, así como la asociación que presentan con EAI. Mencionaremos las principales patologías relacionadas a la presencia de anticuerpos antinucleares. Incluimos los objetivos, justificación, material y métodos, así como la metodología utilizada para llevar a cabo el estudio. Y por ultimo presentamos los resultados, discusión y conclusiones obtenidos en nuestro estudio.

2. INTRODUCCION.

Los anticuerpos antinucleares constituyen un amplio grupo de autoanticuerpos dirigidos contra ciertos componentes nucleares. La prueba de AAN es muy útil en el estudio de las enfermedades del tejido conectivo, dispone de una colección particular de anticuerpos (cuyo número ha superado los cincuenta) que ayuda, en algunos casos, a establecer el diagnóstico y en otros, además, a señalar el pronóstico de la enfermedad. La técnica más comúnmente utilizada y recomendada para la detección de AAN, es la Inmuofluorescencia Indirecta (IFI).

Actualmente la mayoría de los laboratorios utilizan células HEp-2 que son líneas epiteliales humanas derivadas de un carcinoma laríngeo (1,2) para la detección de los AAN por IFI.

Las imágenes observadas por IFI, con el microscopio, se diferencian en diversos patrones de fluorescencia: Homogéneo, moteado, periférico, nucleolar, y centromérico. Estos en realidad, traducen, la estructura y ubicación celular del antígeno al que va dirigido el anticuerpo (3).

La valoración de anticuerpos antinucleares por IFI tiene importancia tanto el título de la última dilución obtenida como el patrón de fluorescencia observado. Dichos patrones de fluorescencia han sido relacionados específicamente con ciertas enfermedades del tejido conectivo.

Aunque, el término de Anticuerpos Antinucleares continúa utilizándose de manera habitual, a medida que se han caracterizado los antígenos. Se ha podido comprobar que estos no solo se hallan en el núcleo, hay algunos antígenos localizados por fuera del núcleo, que también son importantes en la autoinmunidad. Realmente son autoanticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares.

3. MARCO TEORICO

3.1 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

La inmunofluorescencia es una técnica que consiste en conjugar colorantes fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, rodamina B de lisamina o ácido 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfónico) con anticuerpos o antígenos, exponiendo después este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frotis de microorganismos o de células, o cultivo de tejidos. Cuando la reacción es positiva y se expone a la luz ultravioleta se producirá fluorescencia observable bajo el microscopio de inmunofluorescencia (4,5)

Hay dos tipos importantes de inmunofluorescencia:

- Inmunofluorescencia directa. La cual emplea anticuerpos a los que se les ha conjugado directamente un fluorocromo.
- Inmunofluorescencia indirecta. En estas técnicas el anticuerpo que reconoce el antígeno no está marcado sino que se utiliza un segundo anticuerpo conjugado con el fluorocromo y dirigido contra la especie del primero.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI), fue introducida por Friou en 1957(6). Y no obstante, sigue siendo la prueba más utilizada y recomendada para la detección de estos anticuerpos específicos en el suero del paciente frente a un determinado antígeno. Las muestras de pacientes se incuban con un sustrato antigénico que permite la unión específica de los autoanticuerpos a los núcleos de las células. Si hay AAN, se forma un complejo antígeno-anticuerpo. Tras el lavado para retirar los anticuerpos unidos de forma inespecífica, se incuba el sustrato con un anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína. Si los resultados son positivos, se forma un complejo estable con tres partes:

El anticuerpo fluorescente unido al anticuerpo antinuclear humano, unido a su vez al antígeno nuclear.

La lectura se hace con microscopio de fluorescencia cuya luz excita al isotiocianato de fluoresceína haciendo que emita luz fluorescente de color verde. La observación de luz verde fluorescente en un objeto del portaobjetos indica la presencia de anticuerpos específicos en el suero contra cierta estructura celular.

3.1.1 MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

3.1.1.a DESCRIPCIÓN

El microscopio de fluorescencia, consta de una fuente de luz (lámpara de mercurio o halógena) la cual debe emitir la mayor cantidad de luz ultravioleta, el microscopio y un sistema de filtros. El filtro de excitación o selección de luz ubicada entre la fuente de luz y el preparado, tiene por objeto permitir el paso de ondas de luz con longitud que caiga en el rango azul con el fin que el preparado sea alcanzado exclusivamente por la luz azul y produzca emisión de luz fluorescente. El segundo filtro es el de calor y está ubicado entre la fuente de luz y el filtro de excitación en los microscopios de luz transmitida y entre la fuente de luz y el espejo dicrómico en los microscopios de luz incidente. El tercer tipo de filtro es de barrera, colocado antes del ocular para prevenir daños retinianos que podrían ser causados por rayos ultravioleta que escapan el espejo dicrómico (7).

3.1.1.b FUNCIONAMIENTO

La luz de una fuente de longitud de onda múltiple se mueve a través de un filtro excitador que solo permite que pase la radiación excitada de la longitud de onda deseada. Esta radiación es reflejada por el filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz (por fluorescencia) de una longitud de onda específica y mayor. Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación.

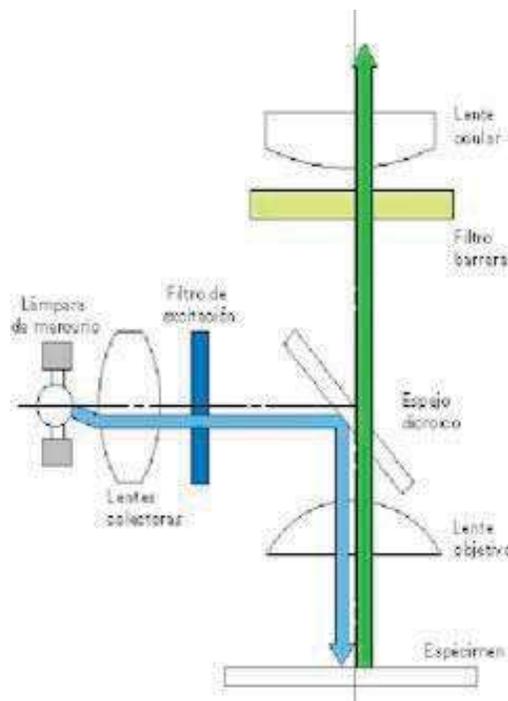


Figura 1. Partes del microscopio de fluorescencia.

3.1.2 SUSTRATO

La prueba de AAN por IFI, es un ensayo en el que originalmente se utilizaron sustratos animales, como hígado de rata y riñón de ratón, pero posteriormente, se encontró que con el uso de sustratos humanos se conseguía mayor sensibilidad.

El sustrato que actualmente se utiliza, para llevar a cabo esta prueba son las células HEp-2, que son una mezcla de células en estado de reposo y en varios estados de mitosis, derivan de un carcinoma epidermoide de laringe humana, y fueron aisladas por primera vez por Moore en 1952(8).

La sensibilidad de esta prueba de AAN por IFI, varía con el tipo de sustrato utilizado, el procedimiento de fijación y los tipos de AAN presentes en el suero. El sistema de análisis con células epiteloides humanas (HEp-2) mitóticas ha demostrado que estas células, son más sensibles y proporcionan un modelo de reconocimiento más preciso que el clásico riñón de ratón.

Posteriormente este sistema de análisis ha sido sujeto a algunas modificaciones, tal es el caso del sistema de análisis con células HEp-2000 que son células HEp-2 que además han sido transfectadas con varias copias de la secuencia de ADN específica que transporta la información del autoantígeno SSA/Ro (9).Las células transfectadas (aprox.10-20%) expresan ese antígeno en exceso, por lo que la detección de autoanticuerpos contra SSA/Ro es más homogénea que en las células HEp-2 no tranfectadas, por tanto se considera como una prueba confirmadora de la presencia de anticuerpos contra SSA/Ro.

3.2 PATRONES NUCLEOLARES

Los patrones que se observan por inmunofluorescencia dependen de la especificidad del anticuerpo, pero no siempre determinan con certeza su tipo; los AAN producen gran variedad de patrones, los cuales pueden variar aún en el mismo individuo según las circunstancias, incluso se pueden encontrar patrones mixtos en un paciente dado. Por inmunofluorescencia indirecta con células HEp-2 se pueden identificar los siguientes patrones:

Homogéneo.

Consiste en una tinción sólida del núcleo, con o sin enmascaramiento evidente de nucleolos. La región cromosómica de las células mitóticas en metafase es claramente positiva, con una intensidad de la tinción suave o periférica superior o igual a la de los núcleos en interfase. Identifica los antígenos nucleares: ADN-histona (ribonucleoproteína o nucleosoma), ácido desoxirribonucleico doble stranded (ADNs), y ácido desoxirribonucleico simple stranded (ADNs).

Los títulos elevados sugieren LES (lupus eritematoso sistémico), incluso los títulos bajos sugieren LES pero pueden encontrarse también en otras enfermedades del tejido conectivo.

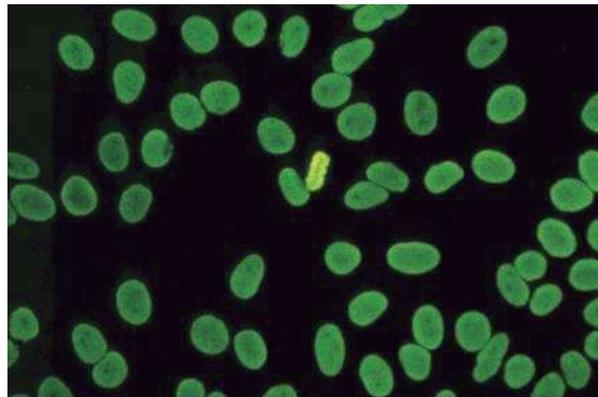


Figura 1. Patrón homogéneo con células HEp-2.

Moteado.

Es una tinción granular áspera (Moteado Grueso) o fina del núcleo, generalmente sin tinción fluorescente de los nucleolos. La región no cromosómica de las células mitóticas en metafase se tiñe, mientras que la región cromosómica no lo hace. Se trata de un patrón un tanto inespecífico ya que identifica diversos anticuerpos contra diversas proteínas nucleares, por lo que debe ser cuidadosamente interpretado de acuerdo al contexto clínico.

Identifica los antígenos nucleares: Sm; RNP; Scl-70; SSA-Ro, SSB-La; y otros sistemas de antígeno anticuerpos aún no caracterizados. Los títulos elevados sugieren LES, cuando identifica el antígeno Sm, el antígeno RNP se asocia con enfermedades mixtas del tejido conectivo; el antígeno Scl-70 se asocia con escleroderma, con el síndrome de Sjögren el SSA y el SSB. Los títulos bajos sugieren otras enfermedades del tejido conectivo: Polimiositis, dermatomiositis, vasculitis sistémicas (10).

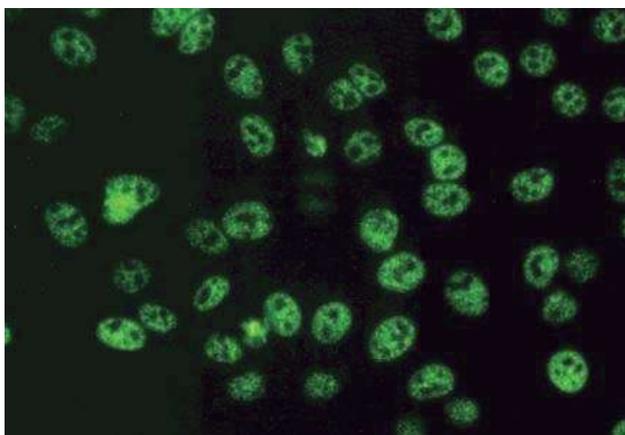


Figura 2.patrn moteado grueso con células HEp-2.

Periférico.

Es una tinción sólida, sobre todo alrededor de la región externa del núcleo, con tinción más débil del centro de éste. La región cromosómica de las células mitóticas en metafase es claramente positiva, con una intensidad de la tinción suave o periférica superior o igual que los núcleos en interfase.

Identifica los antígenos nucleares: Ácido desoxirribonucleico doble stranded (ADNds), ácido desoxirribonucleico simple strand (ADNss), e histona.

Los títulos elevados sugieren LES; los títulos bajos sugieren LES u otras enfermedades del tejido conectivo (11).

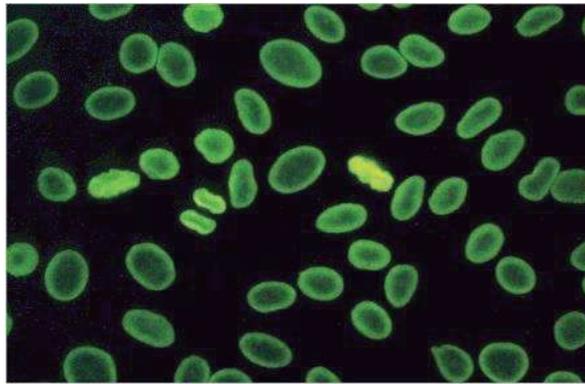


Figura 3. Patrón periférico con células HEp-2.

Nucleolar.

Consiste en una tinción moteada gruesa de grandes dimensiones, generalmente menos de 6 manchas por célula, con o sin manchas finas ocasionales, entre 5 y 10. La región no cromosómica de las células mitóticas en metafase se tiñe mucho, mientras que la región cromosómica lo hace débilmente. Las células en anafase y en telofase pueden teñirse de forma similar a como lo hacen los núcleos en interfase.

Identifica antígenos nucleares que se pueden denominar como ARN 4-6 y otros antígenos nucleolares.

Los títulos elevados prevalecen en la escleroderma y el síndrome de Sjögren (12).

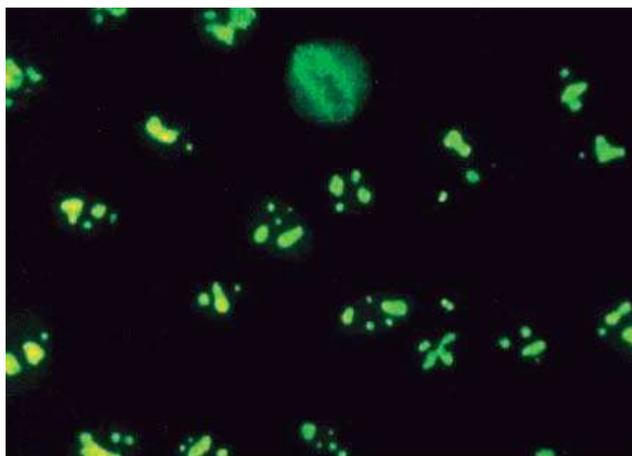


Figura 4. Patrón nucleolar con células HEP-2.

Centrómerico.

Es un patrón de tinción discretamente moteado es muy sugerente de la variante de la esclerosis sistémica progresiva (ESP) que se conoce como Síndrome CREST (forma de ESP con calcinosis importante, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica, esclerodactilia, telangiectasias). Las manchas nucleares son muy discretas y su número suele ser múltiplo de 46 (habitualmente 23-46 manchas por núcleo).

Dado que los centrómeros son constricciones en las que las fibras fusiformes se unen a los cromosomas, las células mitóticas mostrarán la misma reacción de moteado en la región cromosómica. Identifica antígenos nucleares: Centrómero cromosómico (cinetocoro).

Es muy sugerente de la variante de la esclerosis sistémica progresiva que se conoce como síndrome CREST (13).

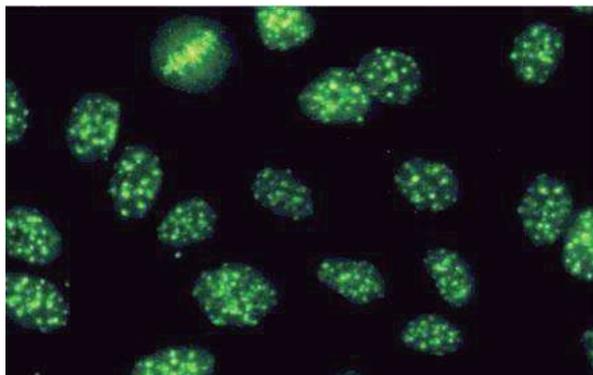


Figura 4. Patrón centromerico con células HEp-2.

Para la identificación correcta de los patrones, es muy importante utilizar sustratos celulares que incluyan células mitóticas, sobre todo para diferenciar anticuerpos dirigidos contra la membrana nuclear de anticuerpos con especificidad ADN/DNP. En sustratos que no incluyen células mitóticas puede ser difícil distinguir el patrón periférico de los anticuerpos contra la membrana nuclear.

En ocasiones es difícil distinguir un patrón de tinción moteado fino de otro homogéneo. Si el patrón es homogéneo, habrá una tinción sólida de los cromosomas de las células mitóticas. Si el patrón es estrictamente moteado, la región fuera de los cromosomas presentara una reacción de moteado fino.

Tabla 1. Patrones de IFI y enfermedades asociadas (14).

Diagnóstico.	Tipos de patrón.
LES	MG, P+H, H, P
Artritis reumatoide	MG,H
Enfermedad Mixta del tejido conjuntivo	MG
Esclerosis sistémica progresiva-difusa.	MG,N
Esclerosis sistémica progresiva-CREST	ACA
Vasculitis	MG

Abreviaturas:MG=MoteadoGrueso,H=Homogeneo,P=Periferico,N=Nucleolar, ACA=anti-centromero.

3.3 PATRONES DEL CITOPLASMA.

Aunque los anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos no suelen asociarse a enfermedades del tejido conjuntivo, se pueden detectar con sustratos de cultivos de células epiteliales (15). Los anticuerpos que se detectan con más frecuencia son los dirigidos contra las mitocondrias y el músculo liso; suelen asociarse a la mononucleosis, la hepatitis activa crónica y las hepatopatías (16,17). Con el sustrato de células HEp-2 también se han demostrado anticuerpos contra el músculo liso en pacientes con verrugas (18).

Anticuerpos anti-mitocondriales (AMA)

Consisten en manchas discretas, concentradas en la región perinuclear de la célula y que se extienden, con menor intensidad, a las regiones exteriores del citoplasma. Hay que distinguirlo de los anticuerpos anti-golgi, que suelen teñir sólo un lado de la región perinuclear, y de los anticuerpos anti-ribosomas, que muestran manchas más finas con aspecto filamentosos compatible con la localización del retículo endoplasmico en el interior de la célula.

Anticuerpos anti-músculo liso (ASMA).

Es una tinción fibrosa muy fina en todo el citoplasma, con aspecto de tela de araña. Al contrario de los anticuerpos antimitocondriales, la tinción de los anticuerpos anti-músculo liso es uniforme en todo el citoplasma, y puede llegar al núcleo. Por lo general, las células mitóticas muestran grandes manchas discretas en el exterior de la región cromosómica (19,20).

3.4 PRINCIPALES ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

Los anticuerpos, como ya hemos mencionado, se dirigen contra una gran variedad de antígenos del núcleo celular, cada uno de ellos tiene distinta especificidad y un diferente significado clínico. Prácticamente se pueden encontrar anticuerpos contra todas las estructuras nucleares, pero entre ellos destacan algunos por su elevado significado clínico.

Anti-ADN (anticuerpo dirigido contra el ácido desoxirribonucleico).

Es un anticuerpo dirigido contra epítopes de la molécula de ADN. Existen dos tipos: el de doble cadena o nativo, muy específico de LES, es ocasionalmente positivo, en título bajo, en la AR severa o en Síndrome de Sjögren: El de cadena sencilla o desnaturalizado es más inespecífico y se encuentra en él LES y en otras entidades, y tiene poca utilidad diagnóstica.

Para confirmarlos se necesitan técnicas especiales *Crithidia lucillae* por IFI, ELISA o radioinmunoanálisis.

Se encuentra en el 60 a 70% de los pacientes con LES activo, principalmente cuando existe compromiso renal, fluctúa con la actividad de la enfermedad y por lo general desaparece con la terapia: ocasionalmente se encuentra en pacientes en remisión o inactivos.

Este autoanticuerpo se sospecha cuando el patrón de la IFI, con células HEp-2 es homogéneo o periférico y se confirma utilizando una de las técnicas especiales (21).

Anticuerpos antihistonas.

Las histonas son grupo de proteínas unidas al ADN. En el hombre se conocen 5 clases principales (H1, H2A, H2B, H3 y H4) y varios subtipos.^{20,21} Se encuentran en el 50 a 70% de los pacientes con LES, por lo general relacionado con actividad; En el 24% de los que tienen AR y en 95% de los casos de Lupus inducido por drogas, principalmente procainamida, hidralazina, clorpromazina o quinidina.

En el Lupus inducido por procainamida, los anticuerpos contra el complejo H2A-H2B y el ADN; Si es por hidralazina, contra el complejo H1, H3 y H4 y en Lupus idiopatico, contra H1 y H2B.

Se utilizan distintos métodos para su detección más específica como: radioinmunoanálisis, inmunotransferencia y enzimoimmunoanálisis.

Anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB.

El Ro y La son Ribonucleoproteínas implicadas en la transcripción y transporte de proteínas, cuya designación deriva de los primeros pacientes en los que fueron descritas.

El antígeno Ro esta formado por dos componentes proteicos de 60 y 52 KD y fragmentos de ARN (hy1, hy2, hy4 y hy5). Este antígeno se encuentra en titulo alto aproximadamente en el 60 a 75% de los pacientes con Síndrome de Sjögren primario e identifica un subgrupo con manifestaciones extra glandulares como vasculitis y púrpura pero no se encuentra en 10 a 15% de los casos de Síndrome Sjögren asociado con AR. También se encuentra en el 25 a 40 % de los casos de los pacientes con LES.

Aproximadamente la mitad de pacientes con LES que tiene anti-Ro también tienen anti-La, este se encuentra en la mitad de los pacientes con Síndrome Sjögren, en 10 a 15% de los sujetos con LES y, rara vez en pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo: También es positivo en cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmune.

La determinación de estos autoanticuerpos esta indicada principalmente en mujeres lupicas embarazadas, en pacientes con historia de fotosensibilidad inexplicable, ante la sospecha de LES con AAN negativos y en individuos con síntomas sugestivos de Síndrome de Sjögren. También se sospechan cuando la IFI se encuentra un patrón moteado, por lo general más fino que e de los anti-Sm y anti-RNP, sin embargo para categorizarlos, se requiere de pruebas confirmatorias como el enzimoimmunoanálisis para su detección (22,23)

Anticuerpos anti-Sm y anti-RNP.

Estos antígenos forman parte de partículas subcelulares compuestas por peptidos unidos a pequeños ARN. La partícula Sm esta compuesta de varias proteínas asociadas (B, B', C, D, E) con pequeños ARN nucleares (U1, U2, U4, U5, U6) y fue descrita por primera vez en un paciente con LES llamada Stephanie Smith de ahí la denominación de Sm. Es especifico de LES, pero solamente se encuentra en 10 a 30% de los casos y tiene significado diagnóstico cuando el Anti-ADN es negativo.

El U1-RNP contiene una proteína de 70 kD, junto a otras denominadas A y C, además del ARNU1(común al Sm), en un titulo alto es sugestivo de enfermedad mixta del tejido conectivo y con frecuencia se asocia con fenómeno de Raynaud, también se encuentra en él LES(30-60% de los casos), pero no se correlaciona con la actividad. La inmunoprecipitación de proteínas y ARN es la técnica más específica para su detección (22,23).

Anticuerpos ANTI-Scl-70 (antitopoisomerasa I).

En la IFI presentan un patrón nucleolar – moteado fino, pero identificarlos se requiere de otras técnicas como la inmunodifusión o ELISA. Se encuentra en el 15-20% de los pacientes con la forma difusa de la esclerosis sistémica, por lo general, asociado con fibrosis pulmonar y a veces compromiso cardiaco o Renal (24,25).

Anticuerpos anticentrómero (ACA).

Reconoce proteínas laminares del cinetocoro cromosómico.

Se encuentra en el 2 a 5% de los pacientes con esclerosis sistémica, pero es más específico de CREST (40-60%). También se puede encontrar en la enfermedad de Raynaud, LES, la AR, y la cirrosis biliar primaria. Cuando se utiliza la línea celular HEp-2 en la IFI tienen un patrón muy típico y característico (centromérico) (26,27).

Antirribosoma (anti-P-ribosomal).

Es un anticuerpo dirigido contra la proteína P (fosfoproteínas) de la subunidad 60 ribosomal. Es específico de LES y se encuentra en 10 a 20 % de los casos, principalmente relacionado con Psicosis y ocasionalmente con nefritis, compromiso hepático y actividad de la enfermedad.

Anticromatina.

Es un autoanticuerpo dirigido contra la cromatina nativa, junto con el Anti-ADN nativo y los antihistonas es frecuente en pacientes con manifestaciones clásicas de LES.

Se encuentra en el 70 a 80% de los pacientes con esta enfermedad y en 95 a 100% de los que tienen Lupus inducido por medicamentos. Es bastante específico de LES y rara vez se encuentra en otras entidades. Es positivo en la tercera parte de los pacientes con LES Anti-ADN negativos.

Anti-RNA polimerasa.

Se encuentra aproximadamente en el 20% de los pacientes con la forma difusa de la enfermedad. Los ARNI y III son más específicos.

Anti-Jo-1.

Es el más común de los antisintetasas, y esta dirigido contra la histidil-t ARN sintetasa, se encuentra en el 20 a 30% de los pacientes con polimiositis y en 10% de los pacientes que tienen dermatomiositis, principalmente asociado con fibrosis pulmonar intersticial, artritis, esclerodactilia, calcinosis y fenómeno de Raynaud.

Anti-SRP.

Es un anticuerpo dirigido contra una ribonucleoproteína citoplasmática, comprometida en la traslocación de proteínas a través del retículo endoplasmico, se encuentra en el 4% de los pacientes con miositis severa.

Tabla 2. Antígenos nucleares y asociación con enfermedades (28).

Antígeno	Asociación
ADN nativo(ADN bicatenario)	LES
Histonas: H1, H2A, H2B, H3, H4, H5.	LE inducido por fármacos, y Artritis reumatoide.
Sm Proteínas y ARN U1, U2, U4, U5 y U6.	LES
U1-nRNP Proteínas y ARNU1	LES, EMTC
Ro/SS-A Ribonucleoproteinas	SS, Lupus neonatal, Lupus cutáneo subagudo, LES.
La/SS-B Ribonucleoproteinas	SS, Lupus neonatal, Lupus cutáneo subagudo, LES
Scl-70 ADN-topoisomerasa I	Esclerosis sistémica progresiva-difusa.
Centromero. Proteínas centroméricas.	CREST, Fenómeno de Raynaud.
PM-Scl Complejo proteico.	Solapamiento:DM/ esclerodermia
Fibrilarina Proteínas y ARNU3	Escleroderma
ARN-Polimerasa I-III	Escleroderma
Jo-1	Polimiositis

Abreviaturas: LES=lupus eritematoso sistémico, EMTC=Enfermedad mixta del tejido conjuntivo, SS=Síndrome de Sjögren, DM=Dermatomiositis.

3.5 TITULO DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

El titulo de una prueba positiva de AAN es importante para el diagnóstico de los trastornos del tejido conectivo. Un titulo bajo tiene menos importancia que un titulo alto. Los individuos sanos tienen títulos negativos o bajos. Los pacientes con trastornos del tejido conectivo generalmente tienen títulos elevados (especialmente los casos de TTC sistémicos). Pueden observarse títulos intermedios o altos en familiares no afectados de individuos con trastornos del tejido conjuntivo, o en personas mayores (24,29), en mujeres gestantes (30,31), en pacientes con infecciones crónicas (32,33), en pacientes con neoplasias (32,33) y en algunos individuos sanos (1, 29,34).

Los títulos de AAN positivos de individuos sanos han sido examinados y se ha encontrado que cerca de un tercio de las personas sanas tienen un resultado positivo a una prueba de AAN, con un titulo de 1:40 (34). Con títulos progresivamente más altos, el porcentaje de individuos sanos con AAN positivos se redujo. El patrón encontrado con mayor frecuencia en individuos sanos es el moteado grueso. Los porcentajes de individuos sanos con títulos de AAN que han sido reportados son los siguientes.

Tabla 3. Prevalencia de la prueba de AAN positiva con títulos diferentes en individuos sanos (34)

Titulo.	Prevalencia (en porcentaje).
1:40	32%
1:80	13%
1:160	5%
1:320	3%

Por lo tanto, un título mayor de 1:160 es significativo para el diagnóstico de pacientes con TTC. Los resultados de un análisis de anticuerpos antinucleares deben evaluarse siempre por un médico especialista y deben ser interpretados en el contexto de las manifestaciones clínicas del paciente.

3.6 PATOLOGIAS RELACIONADAS CON LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

Existen diversas enfermedades en las que es de suma importancia el estudio de los anticuerpos antinucleares como una herramienta diagnóstica, entre ellas, destaca sin duda el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) dado su elevada prevalencia en la población general. A continuación hacemos una revisión de cada una de estas haciendo énfasis en el LES por el motivo ya señalado.

Tabla 4. Anticuerpos antinucleares y enfermedades del tejido conjuntivo (28).

Enfermedad.	Sensibilidad.
LES	95-100%
Enfermedad mixta del tejido conjuntivo	100%
Esclerosis sistémica	60-80%
Síndrome de Sjögren	40-70%
Artritis Reumatoide	50-60%
Polimiositis	60-90%
Lupus inducido por drogas	100%
Lupus Discoide	15%
Fenómeno de Raynaud	20-60%

3.6.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES).

3.6.1.a Definición. Es un padecimiento autoinmune crónico con componente inflamatorio muy importante, que cursa con periodos de remisiones y exacerbaciones, que causa daño tisular mediado por mecanismos inmunológicos en diferentes órganos, aparatos y sistemas. La expresión clínica de este padecimiento es muy variable como resultado del compromiso sistémico y de una serie de factores relacionados entre sí: genéticos, hormonales y ambientales.

3.6.1.b Epidemiología. El LES es una enfermedad de distribución mundial, afecta a todas las razas con predominio en el sexo femenino en proporción de 9:1, se manifiesta en cualquier edad siendo más frecuente en la etapa productiva y reproductiva de la vida (entre 20 y 40 años, en niños y adolescentes) (35).

3.6.1.c Patogenia. Aun cuando no se conoce su etiología, se han identificado tres factores básicos relacionados con LES: genéticos, hormonales y ambientales.

Factores genéticos Presentación más frecuente (hasta 10 veces) en los familiares de pacientes con LES que en la población general, mayor concordancia entre gemelos idénticos comparada con heterocigotos (60% vs. 9%), asociación de LES con antígenos HLA clase II (HLA-DR2 y DR3) tanto en raza blanca como negra, asociación de LES con enfermedades hereditarias por deficiencia de complemento: C1r, C1s, C1, INH, C4, C2, C5 y C8, principalmente con deficiencia de C2; la deficiencia parcial de C2 en heterocigotos es también más frecuente, del 6% en LES vs. 1% en normales. Esta anomalía congénita se asocia con HLA-A10 y HLA-B18 (33).

Factores hormonales Tiene predominio en mujeres, inicia con frecuencia en los periodos cercanos a la menarquia, durante el embarazo o en el periodo posparto y tiene relación con el uso de anticonceptivos orales y en particular con los que contienen estrógenos. Los estrógenos aumentan la producción de autoanticuerpos y son capaces de ocasionar depresión de la inmunidad celular (36).

Factores ambientales Existe relación entre diversos factores ambientales y el inicio o la exacerbación de esta enfermedad: La exposición a la luz solar, relación entre infección (virus y bacterias) y la exacerbación de la enfermedad, exposición ocupacional a metales pesados como cadmio, mercurio, oro y otros elementos relacionados con la producción de anticuerpos antinucleares como sílice, pesticidas, polivinilo y otros.

Participación de medicamentos en la inducción de anticuerpos antinucleares y lupus: procainamida, hidralazina, clorpromazina, isoniazida, propiltiouracilo y anticonvulsivantes. Y por ultimo también existe relación entre LES e implantes de silicón y desnutrición proteico calorica (36).

3.6.1.d Fisiología patológica. El LES es fundamentalmente una enfermedad con alteración en la regulación inmune, secundaria a una pérdida de de tolerancia de lo propio de modo que los pacientes afectados desarrollan una respuesta autoinmune (contra antígenos propios). Las siguientes son unas de las anormalidades inmunes descritas en el LES

- Disminución de las células T citotóxicas y células T supresoras
- Aumento de las células T helper o CD4+.
- Activación policlonal de células B en etapas precoces de la enfermedad.
- Defecto de la tolerancia de las células B relacionado a los defectos de la apoptosis o deficiencia del complemento lo que conduce a una vida prolongada de células B.
- Defecto en las señales celulares de las células inmunes, expresada por una respuesta aumentada frente al calcio, hiperfosforilación de proteínas citósolicas y factor nuclear kb (NFkb) disminuido.
- Aumento en la producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10).

Además en los modelos lupicos animales y posiblemente también en humanos hay un defecto en la apoptosis: Las células apoptoticas expresan antígenos nucleares en su superficie, las que junto con detritus celulares son eliminadas en forma deficiente en el LES. Su fagocitosis resulta en una estimulación de la respuesta inmune contra los autoantigenos derivados de las células apoptóticas.

Estos múltiples defectos causan eventos en cascada que comienzan con una degradación celular anormal y termina con la producción de autoanticuerpos.

Como las células se degradan anormalmente, ciertos antígenos especialmente antígenos nucleares y péptidos propios "crípticos" son procesados por células

presentadoras de antígeno (macrófagos, linfocitos B , células detriticas) y presentados en el complejo MHC-péptido estimulando la activación y expansión clonal de los Linfocitos T CD4+ autoreactivos. También se plantea que ciertos microorganismos pueden ser procesados por células procesadoras de antígeno en péptidos mimetizados que tienen una gran similitud estructural con péptidos propios ,estimulando a los linfocitos T CD4+ autoreactivos .estas células activadas liberan citocinas (IL-4,IL-6, e IL-10) que activan células B autorreactivas, las que proliferaran y se diferencian en células productoras de anticuerpos que van a producir anticuerpos contra varios antígenos nucleares.

3.6.1.e Manifestaciones clínicas. Los autoanticuerpos de lupus eritematoso atacan diversos órganos como las articulaciones, la piel, el riñón, el corazón, el cerebro y los pulmones entre otros. Como resultado de este ataque hay manifestaciones clínicas o síntomas en diferentes partes del cuerpo, por lo que las expresiones iniciales de la enfermedad son comúnmente síntomas generales (fiebre, malestar, pérdida de apetito y fatiga). Esto se asocia frecuentemente con:

Manifestaciones: articulares (articulaciones de las manos), dolores musculares.

Hematológicas: puede haber anemia hemolítica, linfopenia y trombocitopenia, esta puede incluso llevar a eventos hemorrágicos, produciendo púrpura trombocitopénica.

Dermatológicas: un gran porcentaje de los enfermos (80%) presentan eritema malar que es una mancha o erupción en forma de alas de mariposa, localizada en la región del puente de la nariz y de los pómulos (zona malar). También pueden presentar exantema: brote elevado que ocurre por fotosensibilidad cutánea (aparición de brote en áreas expuestas al sol), úlceras en la boca y pérdida del cabello.

Neurológicas: aproximadamente la mitad de los pacientes puede presentar alguna alteración del cerebro, de la médula espinal o de los nervios de la periferia del cuerpo, que se puede manifestar en forma de dolor de cabeza, alteración del pensamiento, convulsiones y trastornos psiquiátricos.

Cardiopulmonares: en el 60% de los casos de lupus ocurre engrosamiento de la pleura, de tipo inflamatorio o pleuresía y pericarditis. Ambas se acompañan de derrame. Puede presentarse neumonitis, que se acompaña de fiebre, dificultad para respirar y tos.

Renales: los riñones están comprometidos en más de una tercera parte de los pacientes con lupus, presentando glomèrulonefritis, por el cual se produce pérdida de proteínas en la orina, lo que puede llevar a edema.

Gastrointestinales: en algunos pacientes puede presentarse hepatitis lúpica, dolor abdominal y diarrea.

Oculares: los ojos son afectados en pocas ocasiones (15% de los pacientes). Entre las manifestaciones oculares está el síndrome de Sjogren o de ojo seco, en el cual no hay producción de lágrimas, por lo que es factible presentar úlceras. De la misma manera es posible que ocurra inflamación de la conjuntiva y de los vasos de la retina.

Obstétricas: en el 30% de las embarazadas afectadas con LES puede producirse muerte fetal. Además, las pacientes pueden presentar síndrome de anticuerpos antifosfolípido secundario al LES, que consiste en la presencia de varios anticuerpos, entre ellos el anticoagulante lúpico y el anticuerpo anticardiolipina, que están relacionados con trombosis recurrente, abortos de repetición y trombocitopenia.

Vasculares: como ya hemos mencionado, en pacientes con LES que además presentan niveles altos de anticuerpos antifosfolípidos, puede ocurrir trombosis. También se produce vasculitis, que es la inflamación de los vasos sanguíneos. Aproximadamente un 20% de los enfermos pueden presentar síndrome de Raynaud, en el cual ciertas personas presentan una reacción al frío que consiste en la palidez de los dedos de manos y pies, seguida por un color morado (cianosis), para terminar con un color rojo encendido (hiperemia). La última fase puede ser bastante dolorosa. Este fenómeno puede estar asociado a crioglobulinemia, que es la presencia de anticuerpos que se sedimentan a bajas temperaturas (4°C) y pueden desencadenar éste y otro tipo de eventos (37).

Tabla 5. Algunas Manifestaciones del lupus Eritematoso Sistémico (37).

Generales: Fiebre, malestar general, pérdida de apetito.
Piel y mucosas: Eritema en mariposa, úlceras en la boca, caída del cabello.
Articulaciones: Artritis con dolor marcado.
Riñones: Exámenes de orina y función renal que sugieren enfermedad renal.
Membranas que recubren el corazón y los pulmones: Pericarditis, Pleuritis.
Sangre: Anemia hemolítica, disminución de leucocitos y plaquetas.
Sistema Nervioso: Convulsiones, trastornos psiquiátricos.
Obstétricas: Abortos.
Oculares: Síndrome de ojos secos.

3.6.1.f Curso de la enfermedad La enfermedad puede tener períodos de tranquilidad o pocos síntomas (inactividad), que duran hasta 5 años en promedio, o períodos de exacerbación (actividad).

3.6.1.g Laboratorio. Una de las pruebas más característica del LES son los anticuerpos antinucleares, en ausencia de ellos el diagnóstico de lupus es improbable pero no imposible. Se pueden hallar diferentes variedades de anticuerpos antinucleares, como anti-ADNn, cuya especificidad alcanza el 100% sobre todo cuando se detecta a títulos o concentraciones elevadas. El porcentaje de pacientes con LES que tienen anti-ADNn varía entre 25 a 85%(38). Es útil corroborar la presencia de anti-ADN con alguna prueba específica, tal como el ELISA, para lograr su cuantificación.

Los anticuerpos anti-Sm son relativamente específicos de LES (es muy infrecuente encontrarlos en otras enfermedades) y pueden utilizarse como ayuda diagnóstica. Se

hallan presentes solo en un 15-30% de los pacientes Lupicos (39). Los anti-RNP pueden observarse en un 30-40% de enfermos con Lupus, pero no son específicos (38). Los anticuerpos dirigidos contra SSA/Ro se detectan en un 30-60% de lo pacientes con lupus (40). También son útiles los niveles sanguíneos de complemento (C3, C4) Las cifras bajas implican actividad de la enfermedad. Los pacientes expresan en la sangre otras alteraciones, como anemia crónica e indicadores inespecíficos de inflamación como aumento de la velocidad de sedimentación globular. El examen general de orina (EGO) es importante, porque cuando los riñones están afectados, se encuentran alteraciones como hematuria, proteinuria, leucocituria y presencia de cilindros, también puede haber alteración en la filtración del riñón y reflejarse en pruebas de función renal, como creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN). En algunos casos puede ser necesario realizar una biopsia renal, para confirmar el diagnóstico de nefritis secundaria al LES (37).

Tabla 6. Exámenes de laboratorio útiles en Lupus Eritematoso Sistémico.

1.- Anticuerpos Antinucleares o AANs: son anticuerpos contra el núcleo de la célula, son bastantes específicos. Algunos son anti-ADN y antiSm.
2.- Anti-DNA por ELISA
3.-Niveles de complemento en la sangre (C3, C4, CH5O): Son un grupo de proteínas de defensa, cuyos niveles están disminuidos en procesos inflamatorios como el Lupus.
4.-Cuadro Hemático: Muestra anemia hemolítica y disminución de los leucocitos.
5.-Velocidad de sedimentación globular: Se encuentra aumentada en procesos inflamatorios.
6.-Parcial de orina y pruebas de función renal: Muestran compromiso de los riñones.
7.-Biopsia Renal: En pacientes con compromiso renal

3.6.1.h Diagnóstico. Es difícil de realizar al comienzo de la enfermedad, por la poca especificidad de los síntomas. Es posible dar un diagnóstico definitivo cuando han aparecido las características típicas de la enfermedad y los resultados de los

exámenes lo confirman. Existen 11 pautas que ayudan a determinar el diagnóstico. Se considera que el sujeto que manifiesta 4 o más de estas pautas, presenta lupus eritematoso sistémico.

Tabla 7. Criterios revisados para el diagnóstico de LES (35).

1. - Eritema Malar.
2.-Brote Discoide (manchas rojizas elevadas en piel).
3.-Fotosensibilidad (Brote producido por exposición a la luz solar).
4.-Ulceras en la boca (llagas en la boca, usualmente no dolorosas).
5.-Artritis (comprometiendo dos o más articulaciones periféricas).
6.-inflamación de las membranas que recubren al corazón y pulmones (pericarditis y pleuritis).
7.-Enfermedad de los riñones (proteinuria y cilindros).
8.-Compromiso de la sangre (anemia, trombocitopenia).
9.-Compromiso Cerebral (convulsiones o trastornos psiquiátricos).
10.- Compromiso inmunológico (presencia de anticuerpos antifosfolipido o VDRL positivo)
11.-Anticuerpos Antinucleares positivos.

3.6.1.i Tratamiento. Se lleva a cabo con diversos medicamentos, dependiendo de la severidad de la enfermedad y los órganos afectados, en general se emplean medicamentos Antiinflamatorios, Corticoides, e Inmunosupresores (Los más utilizados son la azatioprina y la ciclofosfamida).

3.6.2 ARTRITIS REUMATOIDE (AR).

3.6.2.a Definición. Es una enfermedad sistémica autoinmune, caracterizada por provocar inflamación crónica de las articulaciones, que produce destrucción progresiva con distintos grados de deformidad e incapacidad funcional. En ocasiones, su comportamiento es extraarticular: puede causar daños en cartílagos, huesos, tendones y ligamentos de las articulaciones pudiendo afectar a diversos órganos y sistemas, como ojos, pulmones, corazón, piel o vasos. A pesar de que esta patología no necesariamente implica la presencia de anticuerpos antinucleares en el suero de los pacientes, muchos de ellos si los presentan, por lo que decidimos incluir en el presente trabajo una revisión acerca de esta enfermedad dado que es la enfermedad autoinmune más frecuente, y por esto incluimos un pequeño grupo de familiares de pacientes con AR en nuestro estudio.

3.6.2.b Epidemiología. La AR afecta en particular a pacientes del sexo femenino, en una relación de 5 mujeres por cada hombre. El pico de la incidencia de la enfermedad se encuentra entre la tercera y cuarta década de la vida sin embargo la enfermedad puede aparecer en cualquier edad aunque, por definición luego de los 16 años. Cuando ocurre antes de esa edad se considera artritis reumatoide juvenil (35).

3.6.2.c Etiología. La causa de la AR sigue siendo desconocida, aunque hay datos que indican que podría ser desencadenada por una infección en individuos genéticamente predispuestos. En el desarrollo de la enfermedad intervienen factores tanto genéticos como ambientales

3.6.2.d Patogenia. La característica histopatológica de la enfermedad consiste en un infiltrado mononuclear de la membrana sinovial rico en linfocitos TCD4+ y, en menor grado de Linfocitos B. Estos últimos son los responsables de la síntesis de autoanticuerpos (factor reumatoide, antipeptidos citrulinados cíclicos).

En la AR existiría una respuesta autoinmune contra un péptido o, péptidos artritogenico, el cual, presentado en el contexto de moléculas HLA (Alelos portadores

del epitope compartido) y en individuos susceptibles (genes HLA y no HLA asociados a la enfermedad) desencadenaría una respuesta inflamatoria crónica. En AR existe un desequilibrio entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, siendo el exceso de las primeras, por acción autocrina y paracrina, el responsable de la actividad y cronicidad de la enfermedad (35).

3.6.2.e Manifestaciones Clínicas. Es una enfermedad sistémica aunque las evidencias mayores son del sistema musculoesquelético (articulaciones y estructuras relacionadas). La AR es el prototipo de las enfermedades reumáticas articulares inflamatorias: es una poliartritis (polisinovitis) crónica generalmente simétrica, con cierta predilección (al menos inicial) por las interfalángicas proximales de las manos, las metacarpofalángicas, muñecas, rodillas y codos, aunque puede afectar cualquier articulación que posea sinovial. Con frecuencia hay pródromos imprecisos como fatigabilidad, anorexia, pérdida de peso y es habitual que la sintomatología articular siga un curso gradual progresivo aunque también puede iniciarse en forma aguda al menos en la quinta parte de los pacientes (en estos casos aparecen síntomas como fiebre y ataque al estado general) (37).

3.6.2.f Pronóstico. La artritis reumatoide es una enfermedad con un espectro muy amplio y variado, que abarca desde las formas más leves de la enfermedad que precisan escaso tratamiento y compatibles con una vida completamente normal, hasta las formas más graves de la misma que pueden llegar a acortar la esperanza de vida del paciente, sobre todo si se complica con otras enfermedades. Es muy importante el diagnóstico precoz con el objeto de iniciar el tratamiento lo antes posible, ya que los dos primeros años de la evolución de la enfermedad son claves y un control adecuado en este momento mejora el pronóstico funcional de estos pacientes.

La expectativa de vida promedio para un paciente con este tipo de artritis puede verse reducida entre 3 y 7 años en los casos y de 10 a 15 años en los severos. Sin embargo, a medida que mejora el tratamiento para la artritis reumatoide, la

discapacidad severa y las complicaciones potencialmente mortales parecen estar disminuyendo.

3.6.2.g Laboratorio. Factor Reumatoide es una inmunoglobulina generalmente IgM, dirigida contra la fracción Fc. de las inmunoglobulinas de clase IgG. No es muy sensible ni específico (sensibilidad 66%, especificidad 87%), y puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes, en enfermedades neoplásicas, infecciones crónicas e incluso en personas sanas.

Anticuerpo anti-peptídico citrulinado. Se ha sugerido que en la AR una variedad de autoantígenos actúan como inductores de la respuesta inmune. Recientes estudios han demostrado que modificaciones postraduccionales de las proteínas pueden ser importantes en el desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como AR. En particular, la citrulación que ocurre en algunas proteínas sinoviales induce la síntesis de anticuerpos conocidos como anti-peptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) los cuales tienen alta sensibilidad (84%) y especificidad (95%). Por lo tanto son útiles en el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Hemoleucograma y reactantes de fase aguda. Es frecuente que la AR curse con anemias de enfermedad crónica caracterizada por la disminución de las cifras de hemoglobina con volumen corpuscular medio normal. Durante los episodios de exacerbación de la enfermedad puede manifestarse leucocitosis leve. La determinación de proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG) son importantes en la evaluación clínica y su elevación es característica de la enfermedad en actividad ; su utilidad diagnóstica es muy limitada dado que la elevación de las cifras puede darse en cualquier condición inflamatoria crónica o aguda, incluidos muchos procesos autoinmunes y de origen infeccioso .Son importantes en el seguimiento dado que cuando la inflamación se controla los reactantes de fase aguda suelen disminuir (35).

3.6.2.h Diagnóstico. El diagnóstico de la artritis reumatoide es difícil y debe hacerse siempre por médicos especialistas. De acuerdo al Colegio Americano de Reumatología, se establece el diagnóstico de Artritis Reumatoide cuando están

presentes cuatro de los siete criterios siguientes, siempre y cuando del criterio número uno al cuatro, estén presentes por al menos 6 semanas.

Tabla 8. Criterios de Clasificación del Artritis Reumatoide (35).

1. Rigidez matutina de al menos una hora de duración
2. Artritis en 3 o más articulaciones
3. Artritis de las articulaciones de la mano
4. Artritis simétrica
5. Nódulos reumatoides
6. Cambios radiológicos compatibles con AR
7. Factor reumatoide positivo

Como es de notarse, el factor reumatoide es el criterio menos importante, ya que no todos los pacientes con artritis lo tienen positivo y algunas personas sanas, lo tendrán positivo, sin significar tener la enfermedad.

3.6.2.i Tratamiento. Como la AR es una enfermedad que ofrece tales variantes, el punto esencial en su tratamiento es individualizarlo; además, también son variables las formas de manifestarse y de responder al tratamiento. Los principios generales del manejo de la AR se pueden resumir así:

1. Tratamiento sintomático. Se utilizan Antiinflamatorios no esteroides (AINE), los glucocorticoides tienen un lugar importante como supresor sintomático y se reservan para casos de gran actividad o manifestaciones extraarticulares graves y aquellos que no responden a los AINE.
2. Medidas especiales y especializadas. Tienen como fin el alivio sintomático, la preservación de la función y la integridad articular y del sistema musculoesquelético en general. (Procedimientos fisioterapéuticos, de rehabilitación, quirúrgicos y ortopédicos)
3. Medicamentos modificadores de enfermedad. (Cloroquinas, metotrexate, sulfasalazina, oro inyectable, D-penicilamina, azatioprina, ciclofosfamida, etc.) Su empleo exige el conocimiento del medicamento, riesgos y beneficios.

La biotecnología está permitiendo a los investigadores explorar el papel patogénico del sistema inmunitario en la AR. Los fármacos que se deriven de esta investigación irán hacia las causas subyacentes de la inflamación asociada a la AR. El tipo principal de nuevos medicamentos actualmente en desarrollo, incluyen los anticuerpos monoclonales anti-CD-4 que tienen como blanco las subpoblaciones de Linfocitos-T para interferir en el ataque del sistema inmune sobre el tejido articular. Recientemente se ha iniciado el estudio del DEC-CE9.1(anticuerpo anti CD4 de la firma IDEC Pharmaceuticals) en pacientes con AR. Los tratamientos experimentales con citocinas incluyen anticuerpos monoclonales anti-interleucina-6 y fármacos que tienen como blanco receptores de las interleucinas 1 y 2. Así como también los anticuerpos monoclonales anti-factor de necrosis tumoral (FNT) parecen prometedores.

3.6.3 SÍNDROME DE SJÖGREN.

3.6.3.a Definición. El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune, crónica, inflamatoria que se caracteriza por infiltración linfocitaria de las glándulas exocrinas. Los síntomas clínicos principales y las complicaciones están relacionados con la destrucción de las glándulas y la sequedad de las mucosas. Los síntomas típicos son sequedad de ojos (xeroftalmia) que puede terminar en xerostomía por disminución de la secreción de saliva. Aunque son estos los síntomas predominantes se puede afectar todo el sistema de glándulas exocrinas.

La enfermedad puede ser órgano específico comprometiendo sólo al sistema exocrino o una enfermedad sistémica comprometiendo por infiltración linfocítica a los pulmones, riñones, vasos sanguíneos, músculos o transformarse en una enfermedad proliferativa de las células B.

Por lo tanto el SS puede clasificarse en: Primario, que puede verse aisladamente y Secundario, asociado a otras enfermedades reumáticas (35).

Tabla 9. Manifestaciones clínicas del Síndrome de Sjögren (37).

Manifestaciones clínicas	Porcentaje
--------------------------	------------

Artralgias o artritis	60 %
Raynaud	37 %
Linfadenopatía	14 %
Compromiso Pulmonar	14 %
Vasculitis	11 %
Renal	9 %
Hepático	6 %
Linfoma	6%
Esplenomegalia	3%

3.6.3.b Incidencia y prevalencia. Es el segundo padecimiento reumático más frecuente y es solo es precedido en cuestión de prevalencia, por la Artritis Reumatoide. Ocurre comúnmente en sexo femenino, en una proporción aproximada de 9:1 (37).

3.6.3.c Patogénesis. El Síndrome de Sjögren se caracteriza por la infiltración linfocitaria de glándulas exocrinas y la hiperreactividad de células B, como lo atestigua la existencia de autoanticuerpos circulantes. Esto último se acompaña de una proliferación oligomonoclonal de las células B que se caracteriza por la presencia de cadenas monoclonales ligeras en el suero y la orina y de inmunoglobulinas monoclonales que precipitan con el frío.

El suero de los pacientes con síndrome de Sjögren contiene varios autoanticuerpos dirigidos contra antígenos no específicos de órgano, como ciertas inmunoglobulinas (factores reumatoides) y los antígenos nucleares y citoplasmáticos (Ro/SS-A, La/SS-B) extraíbles (37).

3.6.3.d Laboratorio. Los anticuerpos mas estrechamente relacionados con el SS son los dirigidos contra ribonucleoproteinas Ro/SSA y la La/SSB.

El autoantígeno Ro/SS-A esta formado por tres cadenas polipeptídicas (de 52, 54, y 60 KDa) unidas a los ARN, mientras que la proteína La/SS-B, de 48 KDa se une a los productos transcritos por la polimerasa III de ARN.

La frecuencia de anti-Ro en pacientes de SS es de un 40-60%, si la técnica utilizada es la inmunodifusión, mientras que pueden alcanzar el 90% si la prueba se realiza mediante enzimoimmunoanálisis (38,41)

Los anti-La, que nunca se detectan en ausencia de anti-Ro, son algo menos frecuente, pero ambos ayudan a establecer el diagnostico de SS.

3.6.3.e Tratamiento. Es una enfermedad incurable ya que no hay medicamentos que alteren el curso del SS. El tratamiento consiste en la aplicación tópica de preparados que reemplacen fluidos: hay numerosos tipos de lágrimas artificiales; humidificación oral con agua o con saliva artificial y cuidado extremo de la higiene bucal; geles vaginales. Evitar las drogas que disminuyen la función salival y lacrimal como diuréticos, antidepresivos, antihipertensivos. Son muy pocas las indicaciones de uso de drogas en Sjögren. Se usan los corticoesteroides sistémicos y los agentes alquilantes como la ciclofosfamida para tratar la enfermedad extraglandular progresiva como el compromiso renal grave, neumonitis intersticial, neuropatía periférica o vasculitis sistémica. Es controvertido el uso de cloroquina (37).

3.6.4 ESCLEROSIS SISTÉMICA. (ESCLERODERMA)

3.6.4.a Definición. La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad multisistémica crónica de etiología desconocida que se caracteriza clínicamente por un

engrosamiento cutáneo debido a la acumulación de tejido conectivo y por la afectación de distintos órganos como el sistema gastrointestinal, los pulmones, el corazón y los riñones.

Las alteraciones vasculares, especialmente de la microvascularización, constituyen una característica destacada de la ES. En los distintos pacientes que presentan esta enfermedad se observa variabilidad en la frecuencia de afectación de la piel, no obstante, se pueden identificar dos subgrupos de pacientes, que pueden presentar un cierto solapamiento.

Uno de los subgrupos es el de la *esclerodermia cutánea difusa* que se caracteriza por el rápido desarrollo de engrosamiento cutáneo simétrico en las zonas proximales y distales de las extremidades, la cara y el tronco. Estos pacientes presentan un riesgo mayor de afectación renal y de otros órganos en las fases iniciales de la evolución de su enfermedad. El otro subgrupo es el de *esclerodermia cutánea limitada*, que se define por la aparición de engrosamiento cutáneo simétrico limitado a las zonas distales de las extremidades y la cara. Con frecuencia este subgrupo presenta características del síndrome de CREST, que comprende calcinosis, Fenómeno de Raynaud, alteraciones en la motilidad esofágica, esclerodactilia, y telangiectasia. En la esclerodermia cutánea limitada el pronóstico es mejor, excepto en aquellos pacientes en los que, al cabo de muchos años de evolución, se producen hipertensión arterial pulmonar o cirrosis biliar. También puede aparecer afectación de órganos profundos en ausencia de la afección cutánea, es lo que se denomina *esclerosis sistémica sin esclerodermia*. La supervivencia está determinada por la gravedad de la afectación visceral, sobre todo el lo relativo a los pulmones, el corazón y los riñones (37).

3.6.4.b Epidemiología. La esclerosis sistémica (ES) se observa en todo el mundo y afecta a personas de todas las razas. Esto es raro que comience en la niñez o en varones jóvenes. La incidencia aumenta con la edad, alcanzando su máximo en los decenios tercero a quinto de la vida. En general, afecta aproximadamente a tres

mujeres por cada varón y todavía es más frecuente en las mujeres en los años tardíos de la edad de procrear (37).

3.6.4.c Patogenia. Parecen existir lesiones básicamente en tres niveles: el endotelio vascular, el sistema inmune y el tejido conectivo. El daño vascular (endotelial) sería la lesión primaria responsable de la cascada de acontecimientos posteriores. Es en dicho daño vascular donde los factores ambientales (además de las alteraciones en la inmunidad celular) podrían estar implicados directamente. La alteración vascular endotelial induciría la formación de autoanticuerpos (implicándose la alteración humoral) y la liberación de mediadores celulares (a través de la inmunidad celular y la participación de las células cebadas) que estimularían la proliferación de fibroblastos y la transcripción de genes que expresan proteínas de la matriz extracelular (MEC), conduciendo a la síntesis y depósito de colágeno con el consiguiente daño orgánico. En toda esta cascada de acontecimientos la susceptibilidad genética (que viene determinada por una mayor incidencia de sujetos afectados en esta enfermedad de antígenos de HLA -DR-1, DR-3, DR-5) estaría implicada a través de los trastornos del sistema inmune.

La lesión vascular es generalizada, y afecta tanto a arterias, arteriolas como a capilares. La existencia de una lesión endotelial se demuestra por la presencia en el suero de niveles elevados de factor de Von Willebrand. El mediador del daño endotelial es desconocido, pero se han demostrado niveles elevados de interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF); tanto uno como otro, inducen la expresión en la célula endotelial de moléculas de adhesión celular (ECAM-1) y de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), que a su vez inducen la adhesión de linfocitos con el consiguiente daño endotelial.

Además de la lesión endotelial primaria, se produce una proliferación exuberante de la íntima.

También se ha observado una activación de las plaquetas, así como una alteración de los sistemas de coagulación y fibrinólisis.

La esclerodermia se ha descrito asociada a la aparición de varios autoanticuerpos, algunos de ellos muy específicos-como el anticentrómero y el antitopoisomerasa I o

anti-SCL-70. Se ha observado que varios de estos autoanticuerpos tienen fuertes asociaciones inmunogenéticas, como el antitopoisomerasa I con el HLA-DR5 y el anti-PMScl con el HLA-DR3. Pero además de anticuerpos antinucleares, también se han descrito autoanticuerpos contra proteínas de la matriz extracelular que así mismo se encuentran en las paredes vasculares, como son los anticuerpos contra el colágeno tipo I y IV, y contra la laminina.

Se ha encontrado también una alteración en la inmunidad celular, en concreto de linfocitos T CD4 positivos que responden a IL-2 y de los monocitos/macrófagos. Así se ha demostrado un aumento de los receptores de IL-2 y de IL-2 soluble. Los monocitos y macrófagos de estos pacientes responden con un aumento en la producción de IL-2 a la exposición al colágeno tipo I en comparación con las células controles.

Diferentes estudios han demostrado la existencia de fibroblastos alterados en la piel de los pacientes afectados de esclerodermia. Se ha observado que el suero de estos pacientes es capaz de estimular la proliferación de fibroblastos. Se postula (tomando como base los hallazgos serológicos y estudios *in Vitro*) que existirían una serie de mediadores solubles y citocinas que inducirían la proliferación de fibroblastos e incrementarían la producción de colágeno y otros componentes de la MEC, fenómenos que resultarían en un incremento de la fibrinogénesis.

Así, por ejemplo, el factor de crecimiento tumoral beta (TGF-beta) incrementa la producción de colágeno sin inducir la proliferación de fibroblastos, probablemente por un efecto directo sobre la transcripción de los genes que expresan la síntesis del colágeno (se ha demostrado un incremento de los niveles de ARNm); además de inhibir la degradación de diferentes componentes de la MEC. Todo ello resulta en un incremento en el depósito de colágeno con fibrosis (35)

Tabla 10. Manifestaciones Clínicas de la Esclerosis Sistémica (37).

Manifestación clínica.	Porcentaje de pacientes que presentan el síntoma durante la enfermedad.	
	Forma circunscrita	Forma difusa
Fenómeno de Raynaud.	95-100%	90-95%
Engrosamiento de la piel	98%	100%
Calcinosis subcutánea	50%	10%
Telangiectasias	85%	40%
Artralgias/Artritis.	40%	70%
Miopatía	5%	50%
Trastornos de motilidad esofágica	80%	80%
Fibrosis pulmonar	35%	40%
Insuficiencia cardíaca congestiva	<1%	30
Crisis renales.	<1%	15%

3.6.4.d Laboratorio. En las etapas iniciales el típico paciente con ES tiene resultados normales en las pruebas de laboratorio de rutina. Más tarde puede haber anemia

asociada con daño visceral (insuficiencia renal, absorción intestinal deficiente y hemorragia esofágica). En algunos casos hay anemia hemolítica autoinmune, en pacientes con daño renal. Hay hipergammaglobulinemia leve y factor reumatoide positivos en el suero del 30% de los pacientes con escleroderma.

Los Anticuerpos Antinucleares se encuentran presentes en el 40 a 90% de las pacientes con ES. Esta diferencia se debe al tipo de sustrato celular utilizado para la detección de los anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta. Cuando se usan cultivos celulares como sustrato, particularmente líneas celulares de HEp-2, los anticuerpos se encuentran en casi todos los individuos con ES.

Los anticuerpos anticentromero son un marcador sensible y altamente específico de escleroderma limitada (70 a 90%), aunque pueden encontrarse en algunos casos de escleroderma difusa (10 a 20%). Entre el 20 y el 40 % de los pacientes con escleroderma difusa tienen anticuerpos séricos que reaccionan contra un antígeno nuclear de 70 KD llamado Scl-70. Este antígeno ha sido caracterizado como la enzima nuclear topoisomerasa I, que participa en funciones de transcripción y replicación del ADN. Los anticuerpos anti-ADN nativo rara vez están presentes y los niveles de complemento sérico por lo general son normales (37).

3.6.4.e Tratamiento. Al tratarse de una enfermedad de etiología desconocida, no existe un tratamiento causal y, por lo tanto, curativo. Cada manifestación requerirá por tanto, un seguimiento y tratamiento específicos. El objetivo del tratamiento ha de ser conseguir mantener al paciente en una remisión clínica que le permita desarrollar las actividades cotidianas (37).

3.6.5 ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONJUNTIVO.

3.6.5.a Definición. La enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) es un síndrome de superposición caracterizado por la coexistencia de las manifestaciones clínicas propias del Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Esclerosis Sistémica (ES), la Polimiositis (PM) y la Artritis Reumatoide (AR), así como la presencia de títulos muy elevados de anticuerpos circulantes dirigidos contra el antígeno RNP nuclear (el cual se manifiesta como patrón moteado grueso). Este anticuerpo en títulos altos, llamado actualmente anti-U1 RNP, ha servido de justificación para considerar a la EMTC como entidad clínica distinta y separada del LES.

Pero esta idea ha sido cuestionada por quienes consideran a la EMTC como una simple variedad de LES o de la esclerodermia. Otros autores prefieren clasificar a la EMTC como enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo (37).

3.6.5.b Epidemiología. En diversas series se encontró que la EMTC se presenta tanto en la infancia como en la edad adulta, aunque en esta última es más frecuente. La edad varía de cuatro a ochenta años con un promedio de 37 años y franco predominio del sexo femenino (80%). Es una distribución mundial y afecta a los diferentes grupos étnicos.

En las descripciones iniciales se mencionaron especialmente las manifestaciones articulares que recuerdan a la AR, sin embargo, aunque se ha descrito artropatía de tipo mutilante, la artropatía generalmente es deformante. El fenómeno de Raynaud se presenta entre el 77 y el 91% de los casos y, esta manifestación, al igual que el edema de manos se encuentra tanto en el niño como en el adulto. Otras manifestaciones incluyen: esclerodactilia, trastornos de motilidad esofágica, participación muscular similar a la observada en la polimiositis y, en orden decreciente alopecia, eritema malar, serositis, enfermedad cardíaca y enfermedad renal. Esta última parece ser más frecuente en la infancia (36).

3.6.5.c Manifestaciones Clínicas. Las manifestaciones más importantes de la enfermedad son fenómeno de Raynaud, edema de las manos,acroesclerosis, artritis y

miositis. La conjugación de por lo menos tres de estas alteraciones, con participación invariable de al menos una de las dos últimas, junto con la presencia en suero de anti-RNP a títulos mayores de 1:160 por hemaglutinación, han sido propuestas por Alarcón Segovia como criterios diagnósticos con alta especificidad y sensibilidad. Los pacientes pueden tener acortamiento del cabello frontal, alopecia difusa, fotosensibilidad e incluso eritema en alas de mariposa. Sin embargo, presentan tambiénacroesclerosis, calcinosis, microinfartos en pulpejos y afección esofágica distal, proximal o de tercio medio. Un signo cardinal es el edema de manos. Éste es más persistente del que ocurre en la fase edematosa de la esclerodermia, con dedos extremadamente gruesos. La asociación de éste con cierto grado de esclerosis y el signo de Gottron es muy característico de la enfermedad. La artritis de la EMTC es sólo superada en su gravedad y capacidad destructiva por la artritis reumatoide. Tienen también miopatía difícil de distinguir de la dermatopolimiositis y manifestaciones características como halo en heliotropo y signo de Gottron. El síndrome de Sjögren es un hallazgo constante y es probable que la EMTC sea la causa más frecuente de este síndrome en niños.

La afección renal ocurre, pero es poco frecuente y en forma tardía, puede ocurrir hipertensión pulmonar que puede ser mortal (37).

3.6.5.d Laboratorio. La determinación de anticuerpo a RNP-U1 a títulos altos (> de 1:160), tiene gran valor diagnóstico. En algunos pacientes el anticuerpo es persistentemente positivo. En otros puede fluctuar. En algunos casos el anticuerpo aparece al poco tiempo de iniciar tratamiento con corticoesteroides. Este anticuerpo da un patrón moteado en estudios e inmunofluorescencia. Otro hallazgo característico es el factor reumatoide, que puede ser fluctuante de positivo a negativo y con títulos altos variables (37).

Criterios para la clasificación diagnóstica de la enfermedad mixta de tejido conjuntivo (36).

1.- Serológico:

Anticuerpos anti-U1RNP positivos por hemaglutinación a título > 1:160

2.- Clínicos:

Al menos tres de los siguientes:

-Edema de manos

-Sinovitis

-Miositis (confirmada por laboratorio o biopsia)

-Fenómeno de Raynaud

-Acroesclerosis (con o sin escleroderma proximal)

3.6.5.e Tratamiento. El tratamiento de la EMTC es esencialmente el mismo que se aplicaría a las enfermedades del tejido conjuntivo ya citadas, que componen este síndrome. En más de la mitad de los pacientes la evolución es favorable. La supervivencia a los 10 años es aproximadamente del 80%, pero varía dependiendo de la enfermedad del tejido conjuntivo que acaba desarrollándose.

Inicialmente se considero que los pacientes con EMTC respondían favorablemente al empleo de corticoesteroides, y rara vez presentaban compromiso renal y que tenían un pronostico favorable. Con un mejor conocimiento de esta entidad y tomando en cuenta que las manifestaciones clínicas son usualmente progresivas, el plan de tratamiento es susceptible de modificarse y deberá ser dirigido a controlar síntomas específicos tales como la disfagia, fenómeno de Raynaud y síntomas articulares, reservándose el empleo de esteroides y drogas citotóxicas para aquellos casos en los que la hipertensión pulmonar, miopatía, las alteraciones renales y las cardiacas sean las predominantes (37).

3.6.6 DERMATOMIOSITIS Y POLIMIOSITIS.

Definición La dermatomiositis (DM) y la polimiositis (PM) son las principales miopatías inflamatorias idiopáticas. Constituyen un grupo de enfermedades de etiología desconocida que se caracterizan por la existencia de una lesión inflamatoria muscular, asociada a necrosis de células musculares, lo cual se traduce en debilidad muscular. Estas dos enfermedades son consideradas por algunos autores como formas de expresión diferentes dentro del espectro de un mismo proceso patológico, no obstante, se han demostrado diferencias significativas en los cambios anatomopatológicos y en el fenotipo del infiltrado inflamatorio de las lesiones musculares de ambos procesos, las cuales sugieren diferentes mecanismos patogénicos entre ellos.

Se pueden manifestar a cualquier edad, pero se ha observado la existencia de dos picos de máxima incidencia: uno en la infancia (en individuos generalmente menores de 10 años) y otro entre los 45 y los 60 años. Es dos veces más frecuente en mujeres que en hombres. La incidencia de DM y PM varía en diferentes estudios, oscilando entre 1 y 30 casos por 106 habitantes y año con una prevalencia de aproximadamente 10 casos por cada 106 habitantes. En los casos de DM juvenil y en los pacientes con anticuerpos anti-Jo1 se ha demostrado una mayor incidencia en los meses de primavera que en el resto del año. En el caso de la DM juvenil existen evidencias de una relación con la infección por el virus coxsackie B, la cual también es más prevalente en los meses de primavera (36).

3.6.6. a DERMATOMIOSITIS

En esta enfermedad, uno de los primeros hechos que ocurren es la activación de la cascada del complemento, sea por la vía clásica o por la alternativa, lo que conduce al depósito en los capilares musculares de la fracción C5b9 (complejo de ataque de membrana). A partir de la lesión de estos capilares, su número se reduce, lo cual condiciona cambios de microisquemia muscular, la cual a su vez producirá disolución de miofilamentos de las células musculares (agresión subletal) y, en ocasiones, auténticos microinfartos musculares y atrofia. Hasta el momento no está bien establecida

la secuencia de los hechos por lo que se refiere a la presencia de infiltrados inflamatorios en esta enfermedad. Es frecuente que existan infiltrados inflamatorios compuestos por linfocitos B, linfocitos T y macrófagos situados alrededor de los vasos de pequeño y mediano calibre en las biopsias musculares de las DM. En estudios preliminares se está comprobando cómo las células endoteliales de los vasos de las biopsias musculares de pacientes afectados de esta enfermedad expresan moléculas de adhesión leucocitaria del tipo ICAM-1 y VCAM. Es posible que la expresión de estas moléculas pueda justificar la existencia, por migración, de células inflamatorias a la zona perivascular. En la DM, uno de los objetivos de la agresión inmunológica es la célula endotelial (37).

3.6.6. b POLIMIOSITIS

En las PM no se han demostrado estas lesiones capilares y sí, en cambio, se ha evidenciado la presencia de fenómenos de citotoxicidad directa restringida a la expresión de antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad. En condiciones normales y en situaciones de no inflamación muscular, únicamente las células musculares adultas en regeneración y degeneración expresan tales antígenos en su superficie. En las biopsias musculares de los enfermos afectados de PM se ha comprobado que un elevado porcentaje de células musculares expresan estos antígenos, particularmente en las áreas en las que existen fenómenos inflamatorios, y por parte de aquellas células aún viables, pero que están siendo agredidas por células inflamatorias (fenómeno de invasión celular parcial). La inmunodetección de estos antígenos de clase I puede ser de ayuda en la diferenciación morfológica, entre DM y PM, ya que en las segundas la expresión se detecta de forma particularmente intensa en las zonas de hipoperfusión, en lo que se ha dado en llamar estrés celular (37).

3.6.6.c Laboratorio en Dermatomiositis y Polimiositis. Se han descrito una gran variedad de autoanticuerpos dirigidos contra antígeno nuclear y citoplasmáticos en el suero de estos pacientes. Entre los anticuerpos contra antígenos nucleares se incluyen aquéllos dirigidos contra ribonucleoproteínas (anti Ro/SS-A, anti-Sm o anti-La/SS-B) que no son específicos de las miositis, en tanto que están más estrechamente relacionados con el grupo de las conectivopatías mixtas. Aparecen frecuentemente en pacientes con DM y manifestaciones de estas conectivopatías.

Los anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos están dirigidos contra ribonucleoproteínas citoplasmáticas que están involucradas en la traducción y síntesis proteica. Entre ellos se incluyen anticuerpos contra sintetasas, factores de traducción y proteínas de las partículas de reconocimiento de señales. Los más frecuentes son los antisintetasas dirigidos contra las aminoacil-transfer-ARN sintetasas, cuya presencia parece correlacionarse con las manifestaciones extramusculares. El anticuerpo anti-Jo1, dirigido contra la enzima celular histidil-tARN sintetasa supone el 75% de todas las antisintetasas y se detecta en el 25% de los pacientes con miositis, especialmente en aquéllos con alveolitis fibrosante criptogénica, fenómeno de Raynaud, síndrome seco y artritis (42,43). El anticuerpo anti-Ku se asocia al síndrome de solapamiento-DM sistémica, especialmente en los pacientes orientales. Algunos pacientes presentan igualmente niveles elevados de factor reumatoide y se han descrito casos con anticuerpos anticardiolipina especialmente en casos de DM juvenil con complicaciones vasculares. Finalmente, puede haber elevaciones de la velocidad de sedimentación globular, lo cual se había relacionado con una mayor probabilidad de asociación neoplásica. Esta afirmación no ha sido demostrada posteriormente.

3.6.6.d Tratamiento.

Glucocorticoides

El glucocorticoide de elección es la prednisona y se deben evitar los principios activos fluorados, dados sus efectos sobre la musculatura y las alteraciones electrolíticas que pueden determinar

Inmunomoduladores no esteroideos.

En las situaciones en las que se presenta una corticorresistencia (hasta en un 20% de los pacientes) se plantea la necesidad de recurrir a otros tratamientos.

Azatioprina

Para muchos autores es el fármaco preferido dada su eficacia, tolerancia por parte del paciente y relativa seguridad. Requiere de 3 a 6 meses de mantenimiento para producir sus efectos, por lo cual deberá mantenerse como mínimo ese período antes de considerarse no efectivo.

Metotrexate

Considerado menos efectivo que otros tratamientos por algunos autores, presenta mayor riesgo de toxicidad para el paciente.

Ciclofosfamida

Administrada por vía intravenosa u oral, hay resultados contradictorios en cuanto a su efectividad. Parece estar indicado en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial

Inmunoglobulinas intravenosas Es un tratamiento con resultados prometedores pero con un coste económico elevado (36).

4. JUSTIFICACIÓN.

Dada la importancia de la determinación de las AAN en las enfermedades autoinmunes y la poca información que existe acerca de la prevalencia de estos marcadores en la población sana, consideramos necesario hacer la determinación del patrón de AAN en personas sanas, así como en familiares de pacientes y en población relacionada con su diagnóstico y tratamiento, para así poder establecer valores de referencia en nuestro país que puedan ser de utilidad para valorar adecuadamente estos estudios de laboratorio.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Establecer valores de referencia en población sana mestizo-mexicana para la prueba de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar el tipo de patrón detectable de AAN en tres grupos de sujetos sanos de la población mexicana: Donadores de sangre, personal de salud relacionado con dichos pacientes y familiares de pacientes con enfermedades del tejido conjuntivo.
- Determinar los títulos exactos de AAN, en cada una de las personas muestreadas y establecer el porcentaje de la población sana que presenta cada patrón.
- A partir de nuestros resultados, establecer valores normales de AAN, que puedan ser de ayuda al médico para realizar el diagnóstico de enfermedades autoinmunes del conjuntivo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 POBLACION DE ESTUDIO.

Se tomaron muestras a 3 grupos de personas: 104 sujetos sanos con edades entre 25 y 70 años de edad, que acudieron al centro estatal de transfusión sanguínea de la secretaria de salud en el estado de Michoacán.

100 sujetos sanos con edades entre 25 y 70 años de edad, personal de salud del hospital general “Dr. Miguel Silva” incluyendo: médicos, químicos, y personal de enfermería.

100 familiares de pacientes con diagnóstico de enfermedad autoinmune, con edades entre 25 y 70 años de edad que acudan a consulta del servicio de reumatología del hospital general “Dr. Miguel Silva”.

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

El tipo de muestra que se utilizó para realizar el estudio fue el suero sanguíneo. Se obtuvieron aproximadamente 5 ml. de sangre por venopunción aséptica, con un tubo de vacío estéril, dejando que la sangre coagulara, enseguida separábamos el suero del coágulo por centrifugado. No se utilizaron sueros que mostraran grados elevados de hemólisis, ictericia, lipemia o crecimiento microbiano, ya que se pueden obtener resultados aberrantes. Los sueros se conservaron en congelación a temperatura de -20°C, hasta el momento de realizar la prueba

6.3 METODOLOGIA.

Para la detección de AAN se utilizaron los equipos de INMUNO CONCEPTS: Fluorescent ANA test system y Hep-2000 Fluorescent ANA-Ro test system. Ambos constan de un portaobjetos con trece pocillos con sustrato para AAN con células HEp-2 (con figuras mitóticas) cultivadas y estabilizadas directamente en los pocillos de análisis.

La diferencia entre los dos equipos utilizados radica en que con el equipo HEp-2000 fluorescent ANA-Ro las células HEp-2 han sido transfectadas de manera estable con el autoantígeno SSA/Ro. Para el procedimiento, diluimos el suero de los pacientes con solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.4, agregamos 10 µl de suero a 390 µl de la solución amortiguadora, para obtener una dilución 1:40, a continuación se colocaron 25µl de muestra en cada uno de los pocillos del portaobjetos se colocaron también 25µl de cada uno de los controles positivo y negativo para verificar que el procedimiento fuera el correcto, posteriormente la laminilla se sometió a la primera incubación de 30 minutos en cámara oscura y húmeda a temperatura ambiente, el portaobjetos se enjuagó con solución amortiguadora de fosfatos y posteriormente fue sometido a un lavado durante 10 minutos con agitación continua con la misma solución, posteriormente cubrimos cada uno de los pocillos con el reactivo fluorescente para detectar anticuerpos, Las muestras fueron sometidas a una segunda incubación de 30 minutos en cámara oscura y húmeda a temperatura ambiente, después se realizó el enjuaje nuevamente con solución amortiguadora a continuación se añadieron 3 gotas de colorante de contraste azul de evans y se hizo el lavado por otros 10 minutos en agitación continua con solución amortiguadora de fosfatos, se procedió a secar el portaobjetos y agregar una gota de medio de preparación, finalmente se colocó el cubreobjetos y observa al microscopio de fluorescencia. La metodología se explica en detalle mediante diagrama de flujo en el apéndice 1.

Las laminillas de ambos equipos se leyeron en microscopio de fluorescencia en cuarto oscuro a un aumento de 40X y en las muestras que resultaron positivas, se analizó el patrón con aumento 100X.



Figura 5. Microscopio de fluorescencia.

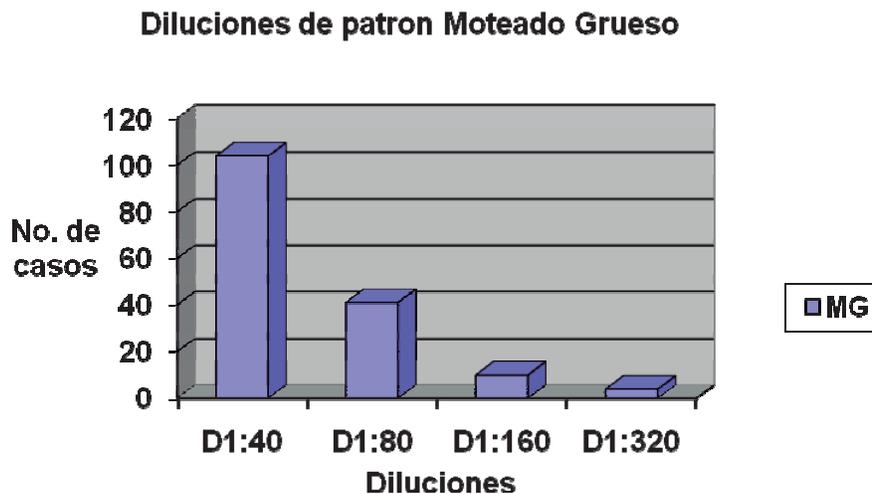
El análisis se llevó a cabo de manera inicial diluyendo la muestra en una proporción 1:40. En caso de resultar positiva esta dilución, se efectuaron diluciones progresivas 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 etc. Se reportó como título la última dilución en la que se observó fluorescencia.

6.4 ANALISIS ESTADISTICO.

Se aplicó estadística descriptiva para el análisis de los resultados, utilizando el programa SPSS versión 12 (SPSS, Chicago, IL). Se calculó la media y desviación estándar para variables continuas y la distribución de frecuencias en números absolutos y porcentajes para las categóricas. En el análisis univariante posterior se aplicó la prueba de χ^2 de Pearson. Fueron considerados significativos los valores de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS.

Características de los pacientes. Se estudiaron 304 individuos, 150 mujeres (49.3%) y 154 hombres (50.7%), todos sanos en el momento del estudio. A todos ellos se les determinaron anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia, analizando tanto el patrón encontrado como la última dilución a la que presentaban positividad de fluorescencia. 165 sujetos (54.3%) presentaron algún patrón de fluorescencia y 141 (46.4%) no presentaron ninguno. El patrón más frecuente fue el Moteado Grueso (50.3%). Se encontraron también el patrón citoplásmico en un 1.0 % de los sujetos, patrón combinado citoplásmico y moteado grueso en un 1.3 %, homogéneo en 2 sujetos (0.7%) y nucleolar en 1 de ellos (0.3%). En cuanto a la dilución a la que fueron positivos los sujetos que presentaron positividad para algún patrón, la dilución más alta encontrada fue, para el patrón moteado grueso, de 1:320 (4 casos, 1.3%) y se observó un mayor número de casos conforme la dilución disminuía, como se ilustra en la gráfica 1.



Gráfica 1. Diluciones del patrón moteado grueso en el total de sujetos estudiados.

Para el resto de los patrones los resultados fueron variables, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 11 .Patrones de AAN encontrados en el estudio.

Patrón.	N ^o de sujetos. n=304	Porcentaje. 100%
Ningún patrón.	141	46.4%
MG.	153	50.3%
Homogéneo.	2	0.7%
Citoplásmico.	3	1.0%
MG+Citoplásmico.	4	1.3%
Núcleolar.	1	0.3%

El total de sujetos sanos fueron clasificados en 3 grupos como ya se mencionó en la metodología del trabajo. En el Grupo 1 se incluyeron 104 donadores del Centro Estatal de la Transfusión sanguínea, en el Grupo 2, 100 trabajadores del hospital General Dr. Miguel Silva, de los cuales 75 (24.7%) son personal médico, principalmente médicos internos de pregrado y médicos residentes, 23 (7.6%) son químicos y personal del laboratorio de análisis clínicos del hospital y 2 enfermeras (0.7%). En el Grupo 3 se incluyeron 100 familiares de pacientes con enfermedad autoinmune, de los cuales 82 son familiares de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (27%) y 18 son familiares de pacientes con Artritis Reumatoide (5.9%). Las características demográficas por grupo se describen en la Tabla 12.

Variable	Grupo 1 n=104	Grupo 2 n=100	Grupo 3 n=100
Edad, años	30.46±9.08	26.8±7.4	35.0±16.2
Hombre/ Mujer	92/12	65/35	73/27

Tabla 12. Características demográficas por grupo de pacientes.

Se analizó el patrón de inmunofluorescencia de los anticuerpos antinucleares en cada uno de los sujetos. Se encontraron los siguientes patrones de fluorescencia: Moteado Grueso, Homogéneo, Nucleolar, Citoplásmico y Patrón combinado citoplásmico con moteado grueso. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Patrones de AAN	Grupo 1 n=104	Grupo 2 n=100	Grupo 3 n=100	<i>P</i>
No presentaron ningún patrón	55	45	41	0.26
Moteado Grueso	46	53	54	
Homogéneo	0	1	1	
Nucleolar	1	0	0	
Citoplásmico	0	0	3	
Moteado Grueso + Citoplásmico	2	1	1	

Tabla 13. Patrones de inmunofluorescencia encontrados por grupo.

Como se puede observar en la tabla, el patrón más frecuente fue el moteado grueso en los tres grupos. Además de determinar el patrón de fluorescencia, se determinó la última dilución de las muestras a la que fue posible percibir positividad en la fluorescencia. En la tabla 14 se muestran las diluciones correspondientes al patrón moteado grueso.

Diluciones de Patrón MGs.	Grupo 1 n=104	Grupo 2 n=100	Grupo 3 n=100	<i>P</i>
1:40	41	26	37	0.074
1:80	8	20	13	
1:160	1	5	4	
1:320		2	2	
1:640				

Tabla14. Dilución del patrón moteado grueso por grupo de estudio.

No encontramos una diferencia significativa en cuanto a la distribución de patrones de fluorescencia con respecto al grupo de estudio, pero sí se puede observar una tendencia al hablar de los títulos del mismo ($p=0.074$): los sujetos en el grupo 1 (donadores de sangre) tienden a presentar diluciones bajas de dicho patrón mientras que los grupos de personal de salud y familiares de pacientes tienden a presentar diluciones más elevadas. Este comportamiento se puede apreciar claramente en el gráfico 2.

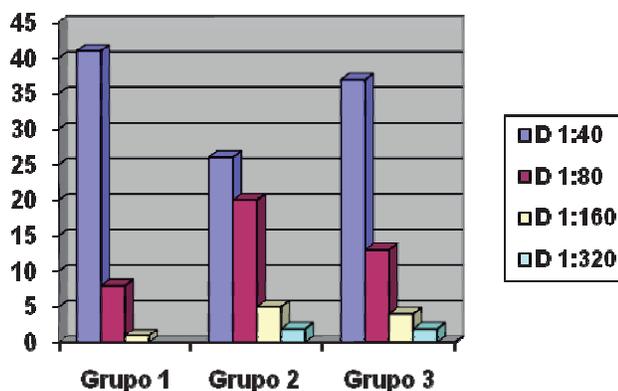


Gráfico 2. Dilución del patrón moteado grueso por grupo de estudio.

Al analizar los resultados de acuerdo a la ocupación de los sujetos, encontramos que el patrón MG se encontró más frecuentemente en los médicos que en las otras ocupaciones ($p=0.022$), los médicos presentaron también títulos más elevados de dicho patrón, como puede observarse en las tablas 15 y 16.

Patrones de AAN	p=0.000 (v5.v14)			
	Otra ocupación	Médico n=75	Personal de Laboratorio n=23	Enfermera n=2
Moteado Gueso	105	47	5	1
Homogéneo	1			1
Nucleolar	1			
Citoplásmico	7			
Moteado Gueso + Citoplásmico	2	1		

Tabla 15. Dentro del Grupo 2, relación del patrón de AAN con la ocupación

Diluciones de Patrón MGs	p= 0.000			
	Otra ocupación n=204	Médico n=75	Personal de Laboratorio n=23	Enfermera n=2
1:40		22	4	1
1:80		19	1	1
1:160		4	1	
1:320.		1		

Tabla16. Dilución de moteado grueso por ocupación.

En el grupo 3 estudiamos a familiares sanos de pacientes con enfermedad autoinmune, analizamos un mayor número de familiares de pacientes con LES.

	Nº de sujetos. n=304	Porcentaje.
No son familiar de enfermo.	204	67.1%
Familiares de pacientes con LES.	82	27.0%
Familiares de pacientes con AR.	18	5.9%

Tabla17. Numero de sujetos del grupo 3 por enfermedad.

Encontramos una mayor proporción de casos positivos en el grupo de familiares de pacientes con AR (%) pero no encontramos una diferencia significativa.

n=100		
Resultado.	Familiares de LES. n=82(100%)	Familiares de AR. n=18(100%)
Positivos.	48 (58.5 %)	11(61.1 %)
Negativos.	34 (41.5 %)	7(38.9 %)

Tabla 18. Resultados obtenidos en el grupo 3 por enfermedad.

Al analizar en forma individual este grupo de pacientes, encontramos nuevamente que el patrón más frecuente fue el moteado grueso. También encontramos que los familiares de pacientes con lupus tienden a presentar patrón MG más frecuentemente que los familiares de pacientes con AR ($p=0.017$), a títulos bajos. (Tablas 19 y 20)

	LES. n=82(100%)	AR. n=18(100%)
No presentan ningún patrón.	34 (41.5 %)	7(38.9%)
MG.	45(54.9%)	9(50%)
Citoplásmico.	2(2.4%)	1(5.6%)
MG+Citoplásmico.	1(1.2%)	1(5.6%)

Tabla 19. Prevalencia de patrones en el grupo 3 por enfermedad.

Dilución.	LES. n=47(100%)	AR. n=9(100%)
1:40	34(72.3%)	3(33.3%)
1:80	10(21.3%)	3(33.3%)
1:160	3(6.4%)	1(11.1%)
1:320	0	2(22.2%)

Tabla 20. Dilución de MG en el grupo 3 por enfermedad.

8. DISCUSIÓN

En la evaluación de una prueba de laboratorio es importante tanto su sensibilidad como su especificidad: La *sensibilidad* de una prueba mide el porcentaje de individuos con enfermedad que tienen resultado de la prueba positivo, la *especificidad* refiere al porcentaje de individuos sin enfermedad cuya prueba es negativa. También es importante considerar los valores predictivos positivo y negativo: El *valor predictivo positivo* es una medida del número de los individuos con una prueba positiva que tienen enfermedad comparada con todos los individuos con una prueba positiva. El *valor predictivo negativo* se define como el número de los pacientes sin una enfermedad que tienen una prueba negativa comparada con el número total de individuos con un resultado de la prueba negativo, incluyendo los que tengan la enfermedad. El valor predictivo negativo y el valor predictivo positivo son influenciados por la prevalencia de la enfermedad en la población. Así pues, si la prevalencia de la enfermedad es baja, la tasa de falsos positivos será alta y por lo tanto el valor predictivo positivo de la prueba será bajo (44).

De acuerdo a lo anterior, podemos afirmar que para hablar tanto de sensibilidad como de especificidad así como de valores predictivos para una prueba en una población dada, primero debemos conocer la prevalencia de resultados positivos y negativos para esa prueba en una población dada. Es ahí donde radica la importancia de este trabajo, pues no hemos encontrado estudios que reporten la prevalencia de anticuerpos antinucleares en población mestizo mexicana en los últimos años.

Existen estudios llevados a cabo en otros países, por ejemplo: en un estudio realizado en Brasil, analizaron la presencia de anticuerpos antinucleares en los sueros de 214 niños sanos y de 116 pacientes con enfermedad autoinmune, con edades desde 0 hasta 20 años y encontraron una prevalencia de 12.6% de entre los niños sanos y 36% entre los pacientes de EAI (45).

En otro estudio, este en población Argentina adulta, se analizaron 2594 sueros, y se encontró una prevalencia de 37.6% de AAN (46). En población asiática infantil, la prevalencia es de 15% a una dilución 1:40 o mayor en este estudio encontraron que los AAN eran positivos en un 9% a dilución 1:40, en 3% a 1:80 y en 3% a dilución 1:160. La dilución más elevada que reportaron fue la 1:160. Existen también estudios realizados en población sajona: En un estudio multicéntrico coordinado por el centro de investigación de la clínica "The Scripps" en California, se estudiaron los sueros de donadores sanos y de pacientes con 5 enfermedades autoinmunes. Los resultados en los donadores sanos fueron positivos para AAN en un 31.7% de los individuos a una dilución de 1:40, 13.3% en 1:80, 5.0% en 1:160 y 3.3% en dilución 1:320. La dilución más elevada encontrada fue esta última (34). Sin embargo, dada la diferencia étnica, los resultados anteriores son difícilmente extrapolables a la población mexicana. Es a partir de esto, que en el presente trabajo nos propusimos determinar los valores normales que se presentan en individuos sanos de la población mestizo-mexicana, y compararlo con población médica y de familiares de pacientes con TTC, para poder así establecer el rango de AAN que pueden presentarse en individuos sanos, o el título que se considere como un "punto de corte" que sea de ayuda al hacer el diagnóstico de pacientes con TTC en nuestra población. En el presente estudio, 54.3% de los sujetos estudiados presentaron un resultado positivo. El patrón más frecuente fue el moteado grueso (50.3%) Este patrón identifica anticuerpos dirigidos a proteínas nucleares no histonas (proteínas ácidas) tales como Sm, RNP, Scl-70, SSA, SSB, ARN polimerasa I y II así como otros sistemas de antígeno-anticuerpo aún no caracterizados.

El que este patrón haya sido el más frecuente se explica por su correlación con varios antígenos, lo que lo hace más inespecífico y mayormente prevalente en población sana sin que esto se relacione con alguna patología.

Este estudio fue realizado utilizando un anticuerpo anti-IgG humana, lo que aumenta la especificidad de la prueba, ya que al utilizar conjugados polivalentes (anti-IgG, IgM e IgA), se detectan anticuerpos sin significado clínico, especialmente por la presencia de anticuerpos IgM naturales (38, 47,48). Debido a que el isotipo IgG es el que más se asocia con enfermedad, es conveniente utilizar conjugado anti IgG para la detección de ANA.

En cuanto al título de los anticuerpos, nosotros encontramos que independientemente del patrón observado, 36.1% de los sujetos tuvieron AAN positivos en dilución 1:40, 13.8 % en dilución 1:80, 4.3% 1:160 y 1.6% 1:320. De acuerdo a estos resultados, para considerar positiva una prueba de anticuerpos antinucleares con patrón moteado grueso, esta debería presentarse en una dilución mayor o igual a 1:160, los resultados con títulos menores deberían considerarse negativos.

De acuerdo a los resultados encontrados en nuestro estudio, los resultados de otros patrones tales como centromérico, periférico y/u homogéneo deben considerarse positivos aún a títulos bajos (1:40)

En general se ha reportado que los individuos sanos tienen títulos negativos o bajos, pero pueden observarse títulos que van de intermedios a altos en familiares sanos de individuos con trastornos del tejido conectivo (TTC), en personas mayores, en mujeres gestantes, en pacientes con infecciones crónicas o en pacientes con neoplasias (49). De acuerdo al grupo de sujetos estudiados, nosotros encontramos una tendencia ($p=0.074$) en el personal de salud y en los familiares de pacientes a presentar diluciones más elevadas que los donadores de sangre. Esto podría explicarse en el contexto de la exposición antigénica a la que se encuentran sometidos estos dos grupos. En el grupo 2, incluimos personal de salud, en su mayoría médicos internos de pregrado y médicos residentes, consideramos que estos al someterse constantemente al contacto con muy diversos enfermos se encuentran en un estado permanente de alerta inmunológica sin que esto se relacione con alguna patología. Algo parecido podría suceder en los familiares de pacientes con enfermedad autoinmune, ya que la convivencia constante puede estimular el sistema inmune, teniendo en cuenta además los factores predisponentes de naturaleza genética y la posible exposición ambiental.

Es por esto que la presencia aislada de AAN sin manifestaciones clínicas acompañantes no puede utilizarse como prueba diagnóstica, pero sí indica que debe realizarse un seguimiento Clínico del individuo. También puede ocurrir que existan familiares de pacientes que aún no se han percatado de ciertos síntomas cíclicos que pueden ser muy sutiles, y que a la luz de un resultado positivo para AAN acuden a consulta, donde estos síntomas son puestos en evidencia y pueden incluso apoyar el diagnóstico de EAI. En este trabajo encontramos 2 casos de familiares de pacientes con resultados positivos (Homogéneo 1:80 y MG 1:320) que no se habían percatado de su sintomatología y que al acudir a consulta se les realizó el diagnóstico de LES.

También se encontró un caso en el grupo de personal de salud con resultado HOM 1:40 al cual no se pudo contactar y darle seguimiento.

Otro hallazgo interesante fue que los familiares de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico tienden a presentar patrón Moteado Grueso más frecuentemente que los familiares de pacientes con Artritis Reumatoide ($p=0.017$), a títulos bajos. Esto puede explicarse debido a que tradicionalmente la Artritis Reumatoide ha sido considerada una enfermedad seronegativa y en estos pacientes habitualmente las pruebas de Factor Reumatoide y Anticuerpos Antinucleares resultan negativas. En cambio, en el Lupus Eritematoso Sistémico la prevalencia de AAN es de hasta el 95% de los enfermos. Esta diferencia en cuanto a prevalencia se ve reflejada no solo en los enfermos sino también en sus familiares.

Ciertos grupos han reportado un aumento en la prevalencia de acuerdo al aumento de edad, en un estudio realizado en 1997 en 3 grupos de pacientes ancianos ingresados en una unidad geriátrica, se encontró una prevalencia del 22% en el grupo de 70-79 años, de 32% en el grupo de 80-89 años y de 42 % en el grupo de 90-99 años (50), sin embargo nosotros no observamos este fenómeno en nuestro estudio. Tampoco observamos diferencia al comparar los pacientes por género.

Metodología empleada para la prueba de AAN

Se utilizan principalmente dos técnicas para la detección de los anticuerpos antinucleares, que son la Inmunofluorescencia Indirecta y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Diversos estudios reportan que la prueba de ELISA, desarrollada recientemente resulta más sencilla y no requiere personal altamente capacitado para su interpretación, por lo que resulta menos subjetiva. Sin embargo, la prueba más utilizada y recomendable para la detección sistemática de los AAN continúa siendo la de IFI, pues a pesar de que muestra menor especificidad comparada con la prueba de ELISA, esto se compensa con un menor costo por prueba y sobre todo una elevada sensibilidad, particularmente si utilizan como sustrato células de cultivo HEP-2, con la cual se detectan AAN hasta en el 95% de los pacientes con LES (51). Además de la prueba de AAN por IFI puede obtenerse tanto el título de la última dilución como el patrón de fluorescencia observado.

Cabe destacar que la demostración de antígenos específicos ha permitido relacionar determinados anticuerpos con enfermedades concretas y así por lo tanto, superar la sola aproximada dependencia que puede obtenerse con los diferentes patrones de inmunofluorescencia, es por esto que se recomienda que después de obtener una prueba positiva con título significativo para los AAN por IFI podría ir seguida del estudio de los anticuerpos específicos que la han ocasionado, es decir, usar la IFI como prueba de tamizaje y el ELISA como prueba confirmatoria, como sugiere el grupo del Hospital Vall d'Hebron, de Barcelona(28).

En cuanto al sustrato utilizado para la realización de la prueba, como ya hemos mencionado, las células HEP-2 son líneas epiteliales humanas, derivadas de un carcinoma laríngeo. Estas células por el gran tamaño del núcleo y los nucleolos, permiten identificar un amplio rango de antígenos nucleolares y citoplasmáticos. Recientemente se ha introducido el empleo de las células HEP-2000, que son células transfectadas con varias copias de la secuencia de ADN específica que transporta la información del autoantígeno SSA/Ro por lo que se puede detectar fácilmente el anticuerpo anti-Ro, ya que aproximadamente del 10 al 20% de las células transfectadas expresan este antígeno en exceso. Los autoanticuerpos contra SSA/Ro pueden mostrar un patrón de tinción distintivo en las células transfectadas.

Si se observa este patrón, el mismo se considera como una prueba confirmadora de la presencia de autoanticuerpos contra SSA/Ro.

En este trabajo, llevamos a cabo una comparación utilizando ambos tipos de células (HEp-2 y HEp-2000) durante el procesamiento de las muestras del primer grupo perteneciente al grupo de donadores sanos y encontramos algunas diferencias notables entre ellas: con las células HEp-2000, se requiere de una mayor experiencia al realizar la lectura correspondiente, ya que las células que han sido transfectadas muestran un patrón que puede confundirse con los habituales patrones de Inmunofluorescencia, incluso haciendo pensar en un patrón mixto o sobrepuesto, lo que hace más complicado realizar una identificación adecuada del verdadero patrón, además estas células suelen verse al microscopio más grandes y menos uniformes que las células HEp -2. Además, los anticuerpos anti-Ro no son muy frecuentes en la población latina (46), por lo la ventaja de su identificación precisa se ve reducida por la desventaja de la dificultad en la interpretación.

9. CONCLUSIONES.

- Para considerar una prueba positiva de AAN con un patrón MG, deberá presentarse en una dilución mayor o igual a 1:160, en títulos menores la prueba deberá ser considerada **NEGATIVA**. Los resultados de otros patrones tales como: homogéneo, centromérico y/o periférico deben considerarse positivos aun a títulos bajos (1:40).
- En la práctica médica, los AAN deben ser ordenados únicamente a los individuos que presenten signos y síntomas sugestivos de EAI.
- Se encuentran títulos incluso de 1:320 en un 1.6 % de la población sana.
- Los títulos altos en familiares de pacientes con EAI y en personal de salud deben ser cuidadosamente interpretados por un especialista y se recomienda un seguimiento clínico de estos sujetos, pues la prevalencia en estos grupos es más elevada que en el resto de la población sana
- El sustrato de elección son las Células Hep-2, ya que aportan resultados más precisos, de interpretación más sencilla y confiable y resultan más baratas que las células Hep 2000.
- La inmunofluorescencia indirecta aporta más sensibilidad y menor costo que la prueba de ELISA, se recomienda utilizar IFI como prueba de tamizaje y ELISA como prueba confirmatoria pero solo en los casos que lo así lo ameriten.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. Provost T, Waston R. Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. In: Norris DA, ed. Immune Mechanisms in Cutaneous Disease. New York: Marcel DEKKE, 1989; 88:211-220.
2. Cook L. New methods for detection of antinuclear antibodies. Clin Immuunol Immunopathol 1998; 88:211-220.
3. Burham TK, Bank P.W. Antinuclear Autoantibodies .Patterns of Nuclear Immunofluorescence.j.invest.Dermatol.62:526-534, 1974.
4. Lynch J, Raphael S, Mellor D, Spare P y Inwod M. 1977. Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana. México. Capítulo 46. pg. 1300-1309.
5. Guzmán M., 1989. Inmunofluorescencia: Fundamentos. INAS. Serie de notas e informes técnicos # 1. 16 p.
6. Friou CJ.Clinical application of Lupus serum nucleoprotein reaction using Fluorescent antibody technique.J Clin Invest 1957; 36:890-7.
7. Abul, K. 1995. Inmunología celular y molecular. Mc-Graw Hill. Madrid-España. Capítulo 5. pg. 99-101.
8. Cortes A .Virus Respiratorio Sincital. Zaragoza España. Mayo 1996.
9. Harmon C.E, Deng J.S, Peebles CL .Tan EM. The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen –antibody system .Arthritis Rheum.27:166-173, 1984.
10. McDuffie F.C, Burch T.N. Immunologic Test in the Diagnosis of Rheumatic Diseases.Bull.Rheum.Dis.27:900-911, 1976.
11. Notman D.D, Kurata N, Tan E.M .Profiles of Antinuclear Antibody in Systemic Rheumatic Diseases.Ann.Int.Med.83:464-469,1975.
12. Von Mühlen C.A., Tan E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases .Sem.in Arthritis and Rheum.24:323.358, 1995.

13. Maroi Y, Peebles C, Fritzler M.J ,etal .Autoantibody to centromere in Sleroderma Será.Proc.Natl.Acad.Sci(USA)77:1627-1631,1980.
14. Adams BB, Mustain DF .The diagnostic value of antinuclear antibody testing. International Journal of Dermatology 2000;39:887-891.
15. Gabbiani G, Ryan G.B ,Lamelin J.P.,et al. Human Smooth Muscle A ntibody.Am.J.Pathol.72:473-488,1973.
16. Mead G.M, Cowin P., Whitehouse J.M.A .Antitubulin antibody in healthy Adult sand Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to smooth Muscle antibody (SMA).Clin.Exp.Immunol.39:328-336,1980.
17. Klatskin G, Kantor F.S, Mitocandrial Antibody in primary Biliary Cirrhosis and other Diseases.Ann.Int.Med.77:553-541, 1972.
18. McMillan S.A, Haire M .Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts.Clin.Exp.Immunol.21:339-344, 1975.
19. Anderson P, Small J.V, and Sobieszek A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies.Clin.Exp.Immunol.26:57-66, 1976.
20. Lidman K, Biberfeld G, Fagraeus A, et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis Clin.Exp.immunol.24:266-272, 1976.
21. Saitta MR, Keene JD Molecular biology of nuclear autoantigens.Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:283-310.
22. Monestier M. Antibodies to histone in SLE and drug induced lupus. Rheum Dis Clin North Am 1992_18:415-36.
23. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Hamburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and test specific autoantibodies to nuclear antigens .Arch Pathol Lab Med 200; 124:71-81.
24. Hidebrant S, Weimer ES, Senecal JL, Noel GS, Earnshaw WC, and Rothfield NF. Autoantibodies to topoisomerase 1: analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme –linked immunoosrbent assay. Clin Immunol Immunopathol 1990; 57:399-410.
25. Okano Y .Antinuclear antibody in systemic sclerosis (sclerodermma). Rheum Dis Clin North Am 1996; 22:709-36.
26. Ferri C, Bernini L, Cecchetti R, et al. Cutaneous and serologic subsets of systemic sclerosis. J Rheumatol 1991; 18:1826-32.

27. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase1. *Arthritis Rheum* 1998; 31:378-85.
28. Fonollosa V, Labrador M, Vilardell M. Anticuerpos Antinucleares en la práctica clínica.
29. Ward MM. Laboratory testing for systemic rheumatic diseases. *Posgrad Med* 1998; 103:93-100.
30. Xavier RM, Yamauchi Y, Nakamura M, et al. Antinuclear antibodies in healthy aging people: a prospective study. *Mech Ageing Dev* 1995; 78:145-154.
31. Kiuttu J, Hartikainen AL, Makitalo R, Ruuska P. The outcome of pregnancy in antinuclear antibody-positive woman. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 37:160-163.
32. Kiuttu J, Hartikainen-Sorri AL, Makitalo R. Occurrence of antinuclear antibodies in an unselected pregnancy population. *Gynecol Obstet Invest* 1992; 33:21-25.
33. Sontheimer RD, McCauliffe DP, Zappi E, Targoff I. Antinuclear antibodies: clinical correlations and biologic significance. *Adv Dermatol* 1991; 7:3-52.
34. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthr Rheum* 1997; 40:1601-1611
35. TRATADO PANAMERICANO DE REUMATOLOGIA
36. Martinez P. Introducción a la Reumatología segunda edición. Intersistemas SA de CV Aguiar y Seijas N°75 11000 México DF.
37. Harrison, Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson. Principios de Medicina Interna Vol I y II Mc Graw Hill Interamericana de España 2002.
38. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Hamburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Med* 2000; 124:71-81.
39. Barada F, Andrews BS, Davis JS, Taylor RP. Antibodies to Sm in patients with SLE. *Arthritis Rheum* 1981; 24:1236-44.
40. Sanchez Guerrero J, Lew RA, Fossel AH, Schur PH. Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SSA and anti-La/SSB (Extractable nuclear antigens) detected by enzyme linked immunoabsorbent assay for the diagnosis of SLE. *Arthritis Rheum* 1996; 39:1055-61.
41. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopolous HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren syndrome. *Arthritis Rheum* 1991; 70:360-74.

42. Miller FW, Waite KA, Biswat T, et al. The role of an autoantigen, hystidil-ARNT synthetase, in the induct in and maintenance of autoimmunity. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:9933-8.
43. Love M. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myositis .Medicine (Baltimore) 1991; 70:360-74.
44. Aboyoussef M, MD. The value of the Antinuclear Antibodies. ASOG .vol 1.april 2004.
45. Esteves ME, Arnaldo C, Campos S y col. Frequency of Antinuclear Antibodies in Healthy Childrenand Adolescents. Clinical Pediatrics, Sep 2004; 43: 637 - 642.
46. Arcavi M, Orfus G. Prevalence of antinuclear envelope antibodies and their isotypes in sera positive for antinuclear antibodies, Medicina B. Aires, 2006:66(4), 327-331.
47. Tozzoli R,Bizzaro N,Tonutti E,et al.Guidelines for the laboratory use of autoantibody test in the diagnosis and monitiring of autoimmune diseases.AM Jclin path 2002;117:316-324.
48. Garde JB,Lopez Longo FJ,Herranz Hermosa JM.Autoanticuepos en las enfermedades del tejido conectivo.Actas Dermosifiliogr 1999;90:1
49. Adams B.B, Mustasim D.F. The diagnostic value of antinuclear antibody testing.International Journal of Dermatology 2000; 39:887-891.
50. Moerloose, F. Boehlen, G. Reber, O. Dechevrens, F. Herrmann, and J.-P Michel Age. Prevalence of anticardiolipin and antinuclear antibodies in an elderly hospitalized population and mortality .Ageing, Jul 1997; 26: 319 - 320.
51. Pacheco S, Campoverde N. Valores de los Anticuerpos Antinucleares, Factor Reumatoide y, complemento en personas normales. Reumatología al día.

1. APÉNDICE.

Diagrama de flujo (Anticuerpos antinucleares).

Diluir las muestras 1:40 en PBS

(10µl muestra + 390µl PBS)



Colocar 25µl por pozo. Montar

Un control más en cada laminilla



Incubar 30+/- 5 min.

En cámara húmeda, temperatura ambiente



Lavados:

- Lavar con pizeta PBS.
- Lavar 10 min. En PBS en agitación.
- Enjuagar con pizeta de agua destilada.
- Escurrir.



Cubrir con el anticuerpo fluorescente

Incubar 30+/- 5 min.

En cámara húmeda, a temperatura ambiente en oscuridad



- Lavar con pizeta PBS.
- 10min. en PBS, en agitación.
(Con 1 gota de azul de evans en
30 ml. de PBS opcional)
- Enjuagar con pizeta de agua destilada.
- Sacudir.



Montar cubre-objetos con 1 gotita de
Aceite de inmersión en cada pozo



Leer con luz U.V (en microscopio de fluorescencia)