

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGIA

***“DETERMINACION DE
ANTICUERPOS ANTI - ANTIGENO
NUCLEAR EXTRACTABLE Y SU
ASOCIACION CON
ENFERMEDADES DEL
COLAGENO”***

Coordinador: Dr. Jorge Fonseca

Carolina Chaves Ulate

1997

DEDICATORIA

A mis padres que me han enseñado los verdaderos valores de la vida y quienes con su sacrificio, ejemplo y cariño me han apoyado y motivado durante todo este tiempo.

A Víctor que con su comprensión y cariño me ha impulsado día con día para seguir siempre adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Fonseca quien me permitió realizar este proyecto bajo su tutoría y quien compartió conmigo durante todo este tiempo sus amplios conocimientos sobre el tema.

A don Gonzalo, Víctor, Ricardo y doña Noemy por su invaluable ayuda y consejos para el éxito del proyecto.

Por último deseo agradecer en forma muy especial a la Dra. Sylvia Molina y a Gary quienes durante todos estos años me han otorgado el privilegio de su amistad y cariño.

RESUMEN

El presente estudio realizado en el Laboratorio de Inmunología del Hospital México tiene como finalidad establecer la correlación de positividad de los E.N.A. y el diagnóstico médico hecho al paciente, con el fin de evaluar el significado diagnóstico y pronóstico de estas pruebas. Para esto se seleccionaron aquellos pacientes que en el tiempo comprendido entre Julio de 1996 y Febrero de 1997 tuvieron positiva alguna de las pruebas para la detección de los E.N.A., de estos pacientes se estudiaron sus expedientes clínicos para obtener el diagnóstico médico de cada uno y así poder establecer la correlación diagnóstico y positividad del E.N.A..

Para determinar la positividad de los E.N.A. se utilizó un E.L.I.S.A. y para los A.N.A. una inmunofluorescencia indirecta sobre células HEP-2.

Los títulos de anticuerpos anti-DNA de doble cadena se determinaron también con ayuda de un E.L.I.S.A. utilizando extractos purificados de ADN de doble cadena.

INDICE

Introducción.....	1
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	6
Materiales y Métodos	7
Determinación inmunoenzimática (E.L.I.S.A.) para ENA	8
Inmunofluorescencia anticuerpos antinucleares	10
E.L.I.S.A. para determinación de anti - ADN de doble cadena	11
Resultados.....	14
Discusión.....	21
Referencias.....	26

INTRODUCCION

Como es que el sistema inmune desarrolla una respuesta humoral y celular contra sus propios componentes intracelulares, es aún hoy un misterio para el hombre. Se han propuesto muchas hipótesis para dar respuesta a ésta interrogante, sin embargo con total certeza no se sabe aun porque el cuerpo humano en ocasiones provoca una situación de "intolerancia inmunológica" trayendo como consecuencia una respuesta autoinmunitaria anormal que puede llegar a ser la causa primaria o el factor secundario de muchos padecimientos del hombre.(17), a pesar de los muchos estudios que se han realizado sobre el tema, en lo único que hasta el momento se esta de acuerdo es que, estos padecimientos autoinmunitarios son la consecuencia de muchos factores endógenos y exógenos que van a variar de un individuo a otro y la ausencia o la presencia de estos factores hará que el padecimiento o enfermedad se manifieste (16).

En la actualidad, aunque no sabemos por que se producen los anticuerpos antinucleares (A.N.A.), gracias a los avances en los campos de la biología molecular e inmunología genética, somos capaces de asignar distintas especificidades antigénicas a muchos autoanticuerpos, a la vez han sido reveladas algunas características estructurales y funcionales de varios autoantígenos, los cuales parecen producir anticuerpos dirigidos contra proteínas nucleares específicas o complejos enzimáticos necesarios para la replicación y mantenimiento celular, entonces se podría pensar que el

mecanismo por el cual estos autoanticuerpos causan daño, es interfiriendo en dichos procesos del metabolismo celular (3).

Entre las enfermedades que tienen como base esta respuesta autoinmunitaria anormal encontramos las llamadas "enfermedades del colágeno" que tienen como común denominador entre otros, la producción de cantidades excesivas de inmunoglobulinas y autoanticuerpos circulantes no específicos. La alta cantidad de autoanticuerpos inespecíficos, presentes en el suero de individuos que padecen estos trastornos, hace posible que los conocidos anticuerpos antinucleares dirigidos contra gran cantidad de antígenos nucleares, se utilicen como apoyo diagnóstico en estas enfermedades (15,19).

Desde que en 1948, el fenómeno de la célula L.E. se describió por Hargraves y col (4) como característica diagnóstica del Lupus Eritematoso, muchas han sido las investigaciones que han demostrado que numerosos constituyentes celulares pueden actuar como antígenos y que es posible no sólo encontrar anticuerpos a estos antígenos en pacientes con Lupus, sino también en innumerables padecimientos más y en personas sin ninguna manifestación clínica, o sea individuos sanos (10).

Anderson (1961) y Holman (1965) detectaron en el suero de pacientes con enfermedades reumáticas anticuerpos precipitantes mediante la técnica de inmunodifusión contra extractos salinos de tejidos humanos, que luego denominaron antígenos nucleares extractables (E.N.A.). Más adelante Clark (1969), caracterizó un sistema de antígenos a los cuales llamó Ro. Posteriormente, Mattioli y Reichlin (1974), describieron el sistema LA y un año más tarde Alspaugh y Tan describen el sistema de anticuerpos SS-A y SS-B los cuales predominaban en pacientes que sufrían del

Síndrome de Sjögren primario, además estos mismos investigadores en 1979 demuestran que los sistemas Ro y SS-A, así como La y SS-B son idénticos inmunológicamente (2). Se han descrito gran cantidad de anticuerpos antinucleares (A.N.A.), pero solo algunos pocos tienen importancia desde el punto de vista clínico, la concentración sérica de algunos de estos autoanticuerpos se ha relacionado con la actividad clínica y su aumento puede predecir la exacerbación de la enfermedad, además se ha observado que algunos de estos anticuerpos son específicos de un determinado padecimiento pero no exclusivos del mismo (8).

A pesar del auge que han tenido estos autoanticuerpos como herramientas útiles para el control de la evolución de la enfermedad y monitoreo de la respuesta terapéutica, existen serios problemas a la hora de evaluar el significado diagnóstico y pronóstico de los A.N.A., esto debido a las diferencias entre las poblaciones estudiadas y en los métodos utilizados para la detección de los mismos (8). Muchos han sido los métodos de detección utilizados a través de los años, hoy su detección se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta sobre monocapas celulares (por lo general y para uniformar resultados se utilizan las células Hep - 2), luego se identifica su especificidad mediante distintas técnicas como la clásica contraelectroforesis, más recientemente por medio del radioinmunoanálisis y el E.L.I.S.A., siendo este último método el más utilizado debido a las facilidades que presenta y a que es la técnica más sensible, además puede usarse para detectar cualquiera de los E.N.A.

El presente estudio realizado en el Laboratorio de Inmunología del Hospital México tiene como finalidad establecer la correlación de positividad de los E.N.A. y el diagnóstico médico hecho al paciente, con el fin de evaluar el significado diagnóstico y pronóstico de estas pruebas. Para esto se

seleccionaron aquellos pacientes que en el tiempo comprendido entre Julio de 1996 y Febrero de 1997 tuvieron positiva alguna de las pruebas para la detección de los E.N.A., de estos pacientes se estudiaron sus expedientes clínicos para obtener el diagnóstico médico de cada uno y así poder establecer la correlación diagnóstico y positividad del E.N.A..

Para determinar la positividad de los E.N.A. se utilizó un E.L.I.S.A. y para los A.N.A. una inmunofluorescencia indirecta sobre células HEP-2.

Los títulos de anticuerpos anti-DNA de doble cadena se determinaron también con ayuda de un E.L.I.S.A. utilizando extractos purificados de ADN de doble cadena.

OBJETIVO GENERAL

Lograr obtener la correlación de positividad de las siguientes pruebas:

SIA™ ENA SCREEN

SIA™ ANTI Sm-RNP

SIA™ ANTI SS-B (La)

SIA™ ANTI SS-A (Ro)

todas de la casa comercial SIGMA® y el diagnóstico hecho al paciente, con el fin de evaluar así la utilidad de estas pruebas como apoyo en el diagnóstico médico final.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A.) Aplicar la técnica de E.L.I.S.A. (Sigma®) para antígeno nuclear extractable.

- B.) Usar el expediente clínico del paciente y de acuerdo al diagnóstico médico establecer la correlación con la positividad del E.L.I.S.A.

- C.) Correlacionar la positividad del E.L.I.S.A. para cada antígeno nuclear extractable con el patrón fluorescente de los anticuerpos antinucleares, para ello se aplicará a cada suero positivo por el E.L.I.S.A. una inmunofluorescencia utilizando substrato de Hep-2 y el antígeno nuclear extractable presente en el suero del paciente.

- D.) Determinar el nivel de anticuerpos anti-DNA de doble cadena presente en los sueros estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la realización de este trabajo se utilizaron los sueros de pacientes del Hospital México, a los cuales se les solicitó durante los meses de Julio de 1996 a Febrero de 1997 alguna de las siguientes pruebas:

- Anticuerpos antinúcleo (patrón fluorescente).
- Anticuerpos anti-Ro/La (SS-A/SS-B).
- Anticuerpos anti-Sm.
- Anticuerpos anti-RNP.
- Anticuerpos anti-E.N.A.
- Anticuerpos anti-D.N.A. de doble cadena.

A todos estos pacientes (total 206), se les aplicaron las pruebas indicadas utilizando las técnicas que se describirán más adelante. Aquellos pacientes que presentaron una o más pruebas positivas se escogieron como grupo de estudio completando un total de 40 individuos para un 19.42%, de cada uno de ellos se reviso su expediente clínico para obtener datos tales como:

- diagnóstico
- edad
- procedencia

- número y clase de pruebas positivas
- tipo de patrón fluorescente de los A.N.A.

Para la aplicación de las pruebas se utilizaron diferentes técnicas:

I. DETERMINACIÓN INMUNOENZIMÁTICA (E.L.I.S.A.) PARA ENA.

La muestra previamente diluida es añadida en los pocillos correspondientes de la microplaca y luego es incubada por un período de tiempo determinado. Durante este lapso de tiempo los anticuerpos anti-E.N.A. se van a unir a los antígenos adheridos a la placa, se lava para remover el material no unido al E.N.A. y se agrega un segundo anticuerpo marcado con una enzima, este conjugado es capaz de reconocer el anticuerpo unido al E.N.A. adherido en la microplaca, y se une a este complejo, se lava nuevamente esta vez para eliminar el exceso de conjugado y se incuba ahora en presencia del sustrato cromógeno de la enzima, luego de un tiempo prudencial se detiene la reacción enzima / sustrato. Por último, para obtener el resultado se mide la absorbancia del color desarrollado a una longitud de onda de 450 nm siendo ésta proporcional a los anticuerpos anti E.N.A. presentes en la muestra.

El ELISA aplicado para determinar los anticuerpos anti-E.N.A. fue de la casa comercial SIGMA® y se utilizaron las siguientes pruebas:

SIA™ ENA SCREEN

SIA™ ANTI - SM/RNP

SIA™ ANTI- SS - B (La)

SIATM ANTI-SS - A (Ro)

Todas ellas se aplicaron con la metodología indicada por la casa comercial sin modificación alguna (13), la misma es descrita a continuación:

→ → → Diluir 1:26 el control negativo, el positivo y el suero del paciente añadiendo 10 ul del suero a 250 ul del diluyente de muestra (Catálogo # s 1529).

1. Depositar 100 ul del diluyente de muestra en el pocillo número uno de la primera tira de la microplaca. Esto será el blanco de reactivo.
2. Depositar 100 ul de control negativo, 100 ul de control positivo y 100 ul de muestra en los correspondientes pocillos de la placa. Completar la adición en 5 minutos. Agitar la placa para asegurarse que la muestra se distribuya uniformemente.
3. Incubar a temperatura ambiente (18 - 26°C) por 45 minutos.
4. Lavar cuatro veces.(Solución de lavado concentrada, catálogo N° s 1779).
5. Pipetear 100 ul del conjugado y colocarlos en cada pocillo. Completar la adición en 5 minutos y agitar la placa para lograr una distribución uniforme del reactivo. (Concentrado: Liofilizado de IgG de cabra antihumana marcado con peroxidasa. También contiene azul de Evans y timerosal 0.03% como preservante. Catálogo N° C 6184).
6. Incubar a temperatura ambiente (18 - 26°C) por 30 minutos.
7. Lavar cuatro veces.

8. Agregar 100 ul del sustrato a cada pocillo. Completar la adición en cinco minutos y agitar la placa.
(Catálogo N° 51 654.3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) 1.25 mmol/L).
9. Incubar a temperatura ambiente (18 - 26°C) por aproximadamente 10 minutos .
10. Pipetear 50 ul de ácido sulfúrico 1N (Catálogo N° 51779 stop solution) en cada pocillo. Completar la adición en 5 minutos.
11. Leer a 450 nm hasta un máximo de 30 minutos luego de que la reacción ha sido detenida.
12. Usar los valores de absorbancia obtenidos para realizar los cálculos.

NOTA: La absorbancia del blanco de reactivo debe ser menor a 0.225, el control negativo menor o igual a 0.200 unidades de absorbancia y el control positivo mayor que 0.200 unidades de absorbancia a 450 nm. Si estos valores no se obtienen las lecturas de las muestras no deben de ser reportadas.

Se reportó como positivos aquellos valores mayores al "punto de corte o "CUT-OFF" y como negativos aquellos menores al punto de corte, el cual se calcula tomando el valor promedio de las absorbancias del control negativo y sumándole 0.200.

II. INMUNOFUORESCENCIA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

Para obtener los patrones fluorescentes se utilizó una inmunofluorescencia indirecta sobre monocapas celulares de HEP-2, los anticuerpos van a reconocer los antígenos nucleares y se adhieren a estos dejando así un patrón típico dependiendo del tipo de anticuerpo presente en el suero del paciente.

A continuación se describe la metodología utilizada:

1. Diluir los sueros a probar y los sueros controles 1:10 con PBS.

2. Cubrir los pozos de las láminas de las células HEP - 2 con la dilución de los sueros y controles a analizar.
3. Incubar 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
4. Lavar 10 minutos con PBS.
5. Cubrir los pozos de las láminas con gamaglobulina polivalente marcada con isotiocianato de fluoresceína en su dilución óptima.
6. Incubar 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
7. Lavar por 10 minutos en PBS y repetir este paso.
8. Montar las láminas con solución de PBS más glicerol y poner un cubreobjetos.
9. Leer al microscopio de epifluorescencia.
10. Resultado positivo será cuando los núcleos de las células HEP - 2 fluorescen. Deben reportarse según los siguientes patrones: homogéneo, periférico, moteado o granular.

III. E.L.I.S.A. PARA DETERMINACIÓN DE ANTIADN DE DOBLE CADENA.

El nivel de los anticuerpos anti- ADN de doble cadena presente en los sueros se determinó usando un ELISA comercial de la casa SIGMA® (Anti - ds DNA) sin modificación alguna:

1. Hacer una dilución 1:21 de los controles positivos, negativos y las muestras, para esto se adicionan 10 ul de cada muestra en diferentes pozos de la placa de dilución y luego se colocan 200 ul del diluyente de muestra en cada pocillo (catálogo N° S 5549).
2. Transferir 100 ul de cada pocillo de la placa de dilución a la placa de prueba. Colocar 100 ul del diluyente de muestra en el pozo A1, para utilizarlo como blanco de reactivo. Transferir también a la placa de prueba 100 ul del calibrador previamente reconstituido.

3. Cubrir la placa con su tapa e incubar a temperatura ambiente (20 - 25°C) por 20 a 22 minutos.
4. Lavar tres veces con el buffer de lavado (Catálogo N° W 2635 solución de fosfato buferizado y Tween 20).
5. Agregar 100 ul del conjugado (IgG de cabra anti humano (cadena gamma) marcado con peroxidasa. Catálogo N° C 9835) a cada pocillo de la placa.
6. Tapar la placa e incubar a temperatura ambiente (20 - 25°C) por 20 a 22 minuto.
7. Lavar tres veces (Ver paso 4).
8. Agregar 100 ul del sustrato (TMB Catálogo N° T 2432 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina en dimetil sulfóxido), en cada pocillo de la placa.
9. Incubar a temperatura ambiente (20 - 25°C) por 10 a 12 minutos. Los pocillos con muestras positivas se tornaran azules.
10. Agregar 50 ul de ácido sulfúrico 1 mol/L y ácido clorhídrico 0.7 mol/L (Stop solution Catálogo N° 55424) a cada pocillo en el mismo orden en que el sustrato fue agregado. Los pozos con muestras positivas pasaran de azul a color amarillo luego de agregar la solución "stop".
11. Medir la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm, dentro de los 30 minutos luego de detener la reacción.

NOTA: El control positivo deberá ser mayor de 180 UI/ml, el negativo menor de 150 UI/ml, y la relación positivo/negativo mayor o igual a 2.00. Si estos resultados no son obtenidos la prueba es invalidada y los resultados no deben de reportarse.

Una densidad óptica del blanco de reactivo mayor de 0.200 indica lavados deficientes o contaminación de los reactivos. Para obtener las UI/ml se debe dividir la densidad óptica de la

muestra entre la densidad óptica del calibrador por el valor del calibrador en UI/mL. Un resultado negativo se obtiene si la muestra tiene menos de 100 UI/mL, y uno positivo si es mayor a 100 UI/mL.

RESULTADOS

Se estudió un grupo de 40 personas, pacientes del Hospital México de los cuales el 90% pertenecen al sexo femenino y el restante 10% al masculino (Gráfico #1). Se encontró que estos pacientes fueron diagnosticados con padecimientos tales como (Gráfico #4):

- ◆ Lupus Eritematoso (L.E.)
- ◆ Esclerosis Sistémica Progresiva (E.S.P.)
- ◆ Vitiligo
- ◆ Síndrome de Sjögren's (S.S.)
- ◆ Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (E.M.T.C.)
- ◆ Artritis Reumatoide (A.R.)

La mayoría de los individuos estudiados provienen de las provincias de San José, Heredia y Guanacaste. Mientras que de las provincias de Cartago y Limón no hubo pacientes, los datos correspondientes se pueden observar en el gráfico #3.

Las edades de los pacientes estudiados se ubicaron entre los 15 y 67 años, obteniéndose el mayor porcentaje entre las personas de edades de 14 a 24 años (Gráfico #2).

Estas 40 personas estudiadas tuvieron durante Julio de 1996 y Febrero de 1997 una o más de las pruebas aplicadas positivas. Se aplicó como se mencionó anteriormente, un E.L.I.S.A. para determinar anticuerpos anti-ENA, anti-SS - A, anti-SS - B, anti-RNP y anti-Sm, obteniéndose los siguientes resultados: 13 individuos presentaron positividad de los anticuerpos anti-SS-A y SS-B, de

ellos 12 fueron diagnosticados con Lupus y 1 con S.S (Cuadro #1). 13 pacientes presentaron anticuerpos contra el antígeno SS-A: 10 fueron diagnosticados con Lupus, 1 con Vitiligo, 1 con A.R y uno con E.S.P. (Cuadro #2). Ninguno de los pacientes presentó positividad para los anticuerpos anti-SS-B.

Por otro lado, si se observa el cuadro #3 , fueron 14 los sujetos que presentaron anticuerpos anti R.N.P., de ellos 12 sufren de Lupus, 1 E.S.P. y 1 E.M.T.C.. En el cuadro #4 se puede observar que en 28 de los 40 sueros analizados los anticuerpos anti-ENA se encontraban presentes, la mayoría de estos 28 individuos fueron diagnosticados con Lupus (23 pacientes) y otros con EMTC, Vitiligo, etc. Para los anticuerpos anti-Sm se obtuvo un total de 15 pacientes positivos, siendo nuevamente el Lupus el diagnóstico de mayor positividad (Cuadro #5).

También, se aplicó una inmunofluorescencia indirecta sobre células HEP - 2 para determinar el patrón fluorescente de los ANA, y los resultados obtenidos se resumen en el cuadro #6, como se puede ver la gran mayoría de los pacientes presentaron patrones homogéneos o moteados, mientras que sólo uno presentó patrón periférico y otro patrón nucleolar.(Nota: de 6 de los pacientes no se encontraron los resultados de esta prueba).

En cuanto a la determinación del título de anticuerpos anti DNA de doble cadena, se tomó como alterado aquel que excediera las 100 UI/ml, de tal forma que se obtuvieron 13 pacientes con títulos mayores y 16 con títulos menores, sin embargo en 13 de los pacientes los resultados no fueron obtenidos.

CUADRO N° 1: TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS (E.L.I.S.A.) POR SSA/SSB, DEL GRUPO EN ESTUDIO SEGÚN DIAGNÓSTICO.

Dx	LES		SS		TOTAL	
	ABS	%	ABS	%	ABS	%
	12	92.3	1	7.7	13	100

CUADRO N°2: TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS POR SSA (E.L.I.S.A.), DEL GRUPO EN ESTUDIO SEGÚN DIAGNÓSTICO.

Dx	LES		VITILIGO		AR		E.S.P.		TOTAL	
	ABS	%	ABS	%	ABS	%	ABS	%	ABS	%
	10	76.9	1	7.69	1	7.69	1	7.69	13	100

CUADRO Nº 3: TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS POR RNP (E.L.I.S.A.), DEL GRUPO EN ESTUDIO SEGÚN DIAGNÓSTICO.

Dx	LES		E.S.P.		E.M.T.C.		TOTAL	
	ABS	%	ABS	%	ABS	%	ABS	%
	12	85.7	1	7.14	1	7.14	14	100

CUADRO Nº 4 TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS POR ENA (E.L.I.S.A.), DEL GRUPO EN ESTUDIO SEGÚN DIAGNÓSTICO.

Dx	LES		A.R		E.M.T.C		S.S		VITILIGO		E.S.P.		TOTAL	
	ABS	%	ABS	%	ABS	%	ABS	%	ABS	%	ABS	%	ABS	%
	23	82.1	1	3.6	1	3.6	1	3.6	1	3.6	1	3.6	28	100

CUADRO Nº 5: TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS POR Sm (E.L.I.S.A.), DEL GRUPO EN ESTUDIO SEGÚN DIAGNÓSTICO

Dx	LES		S.S		TOTAL	
	ABS	%	ABS	%	ABS	%
	13	86.7	2	13.3	15	100

CUADRO Nº6 DISTRIBUCIÓN DE PATRONES FLUORESCENTES DEL F.A.N. SEGÚN DIAGNÓSTICO.

Dx	LES	A.R.	S.S.	E.S.P.	E.M.T.C	VITILIGO	TOTAL
PATRÓN HOMOGÉNEO	14	1	2	1	0	0	18
PATRÓN MOTEADO	13	0	1	0	1	1	16
PATRÓN PERIFÉRICO	1	0	0	0	0	0	1
PATRÓN NUCLEOLAR	0	0	0	1	0	0	1

GRÁFICO Nº 1

Porcentaje de Elementos Femeninos y Masculinos del grupo en estudio

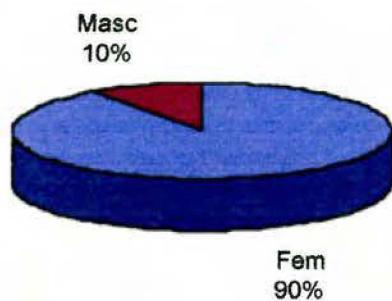


GRÁFICO Nº 2

Distribución de edades de los individuos en estudio.

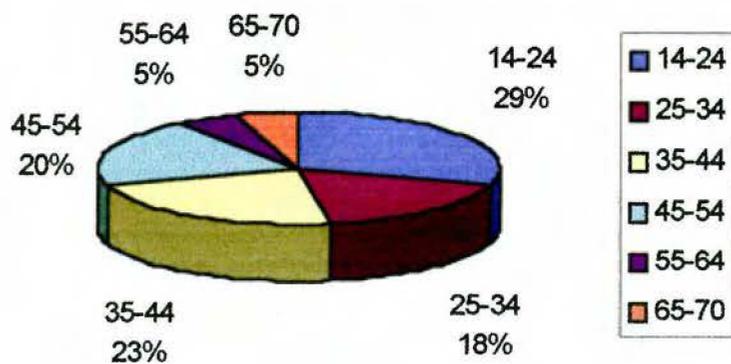


GRÁFICO Nº 3

Lugares de Procedencia de los participantes en el estudio

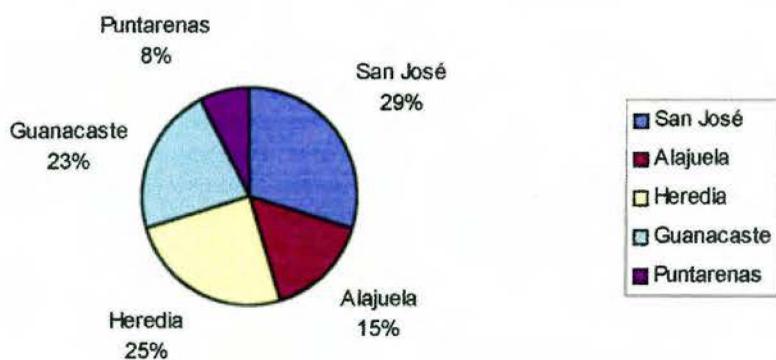
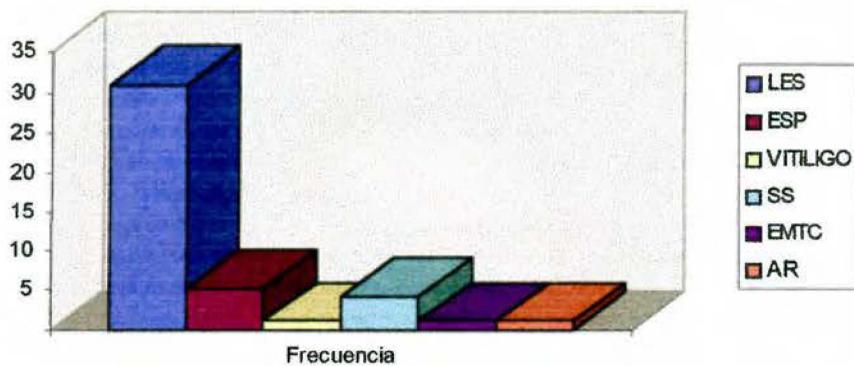


GRÁFICO Nº 4

Total de diagnósticos en la muestra de 40 pacientes del Hospital México.



DISCUSIÓN

El primer hallazgo importante que obtuvimos en este trabajo, fue la confirmación de que este tipo de enfermedades autoinmunes afectan en forma predominante a las mujeres (17), tanto es así que de las 40 personas estudiadas el 90% pertenece al sexo femenino.

La edad promedio de los pacientes en estudio fue de 36 años sin embargo la mayoría de los sujetos se ubicaron entre los 14 y 24 años (29%), no concordando esto con lo reportado en la literatura, sobre todo en lo referente a Lupus, ya que se indica que esta enfermedad afecta mayormente a mujeres de 20 a 40 años de edad (6), y nosotros encontramos que el grupo etario afectado es menor a lo tradicionalmente reportado. La gran mayoría de las personas que participaron en el estudio fueron diagnosticadas con Lupus (31%), esto nos indica que dentro de las colagenopatías la que con mayor frecuencia cursa con altos títulos de E.N.A. es el Lupus.

En cuanto al lugar de procedencia de los individuos en estudio vemos que ninguno de los pacientes residía en Cartago o en Limón, esto debido a que el área de cobertura del Hospital México, no comprende estos lugares.

Los anticuerpos anti SS-A precipitan los ARN citoplasmáticos humanos hY1 - hY5; mientras que los anti SS-B precipitan ARN de origen viral y humanos transcritos por la polimerasa III (1), estos anticuerpos por lo general coexisten en los mismos sueros, debido a que reconocen epitopos específicos semejantes en ambos antígenos.

Por otro lado en la literatura se reporta que si un suero contiene anticuerpos anti SS-B, por lo general tendrá anticuerpos anti SS-A, pero sólo la mitad de los sueros con anticuerpos anti SS-A muestran positividad por los anti SS-B. En nuestro estudio, 13 de los pacientes mostraron pruebas positivas para los anticuerpos anti SS-A y SS-B, 13 más presentaron positividad para el anticuerpo anti SS-A, pero en ninguno de los sueros fueron detectados anticuerpos anti SS-B (como único anticuerpo), lo que concuerda con los resultados reportados por Swaak y col (18), ya que ellos encontraron una baja incidencia de estos anticuerpos en una serie de pacientes estudiados.

Ahora bien, de los 13 sueros positivos por anticuerpos anti SS-A, 10 (76.9%) fueron diagnosticados con Lupus, lo cual correlaciona con lo encontrado por otros autores que reportan de un 40 a un 70% de positividad de anticuerpos anti SS-A detectados mediante ELISA, en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (12).

Por último, de los tres sueros restantes uno corresponde a un paciente con Artritis Reumatoide (AR), uno con Vitiligo y otro a un paciente con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP), representando cada uno de ellos el 7.69%. Lo cual concuerda con lo reportado por Moreno y col (12), ellos encontraron el siguiente porcentaje de SS-A: para AR 5 - 36% y para la ESP de 7 a 46% de positividad de estos anticuerpos en pacientes con los mismos diagnósticos. Algo que llama la atención fuertemente es el hecho que, a pesar de que en la literatura se reporta hasta un 95 a 100% de positividad (1) de estos anticuerpos en el Síndrome de Sjögren (SS), ninguno de los 13 pacientes positivos por SS-A fue diagnosticado con este padecimiento.

En cuanto a los anticuerpos anti-RNP, 14 de los pacientes en estudio presentaron positividad en la prueba. Este anticuerpo ha sido descrito como característico de la Enfermedad Mixta del Tejido

Conectivo (EMTC) pero no exclusivo de ella, ya que también puede ser detectado en padecimientos como el Lupus (9). Otros afirman que la única característica inmunoserológica de EMTC es la presencia de altos títulos anti-RNP en ausencia de anticuerpos antinucleares (ANA) específicos (9). En el grupo que se estudió, encontramos que un 85.7% de pacientes RNP positivos padecen Lupus, siendo este un porcentaje bastante elevado ya que los reportes establecen un 40% de positividad de este anticuerpo en pacientes con Lupus (11). Un 7.14% de los pacientes positivos por RNP tuvo diagnóstico de EMTC y otro 7.14% de ESP.

De los sueros analizados 28 resultaron positivos para los anticuerpos anti-ENA, estos anticuerpos son dirigidos contra muchas pequeñas ribonucleoproteínas que tienen funciones en el procesamiento del ARN, son útiles en el diagnóstico de enfermedades del colágeno, pero no tienen utilidad en el monitoreo de la enfermedad (10). En el 82.1% de los pacientes anti-ENA positivos el diagnóstico fue Lupus y el porcentaje restante se repartió proporcionalmente entre AR, EMTC, SS, Vitiligo y ESP obteniendo cada uno 3.6%. Esta prueba de anticuerpos anti-ENA, se utiliza como tamizaje para evaluar la necesidad de futuras pruebas que determinen la especificidad del anticuerpo, es decir, si el anti-ENA no se encuentra en el suero, se reporta como negativo, pero si encontramos anti-ENA entonces se deben aplicar otras pruebas como anti-RNP, SS-A, SS-B, etc. Algunos pacientes no tuvieron en sus sueros anticuerpos anti-ENA, pero si obtuvieron positividad en otras pruebas como anti-RNP y SS-A; pero todas las personas en que detectaron anticuerpos anti-ENA mostraron alguna especificidad, ya fuera SS-A/SS-B, RNP o Sm.

Por otra parte los anticuerpos anti-Sm, según la literatura consultada son específicos del LES (9, 5) pero a pesar de la alta especificidad reportada su incidencia es muy variable, en los resultados

obtenidos pudimos observar que el SS también presenta cierta positividad en estos anticuerpos (13.3%), sin embargo la mayor parte de los pacientes un 86.7% fueron diagnosticados con Lupus, un porcentaje muy alto con respecto al reportado por otros autores 25 - 48% (9). Los anticuerpos anti-RNP y Sm al igual que los SS-A y SS-B coexisten con frecuencia en los mismos sueros, pero existen sueros con anticuerpos anti-RNP en los cuales no se detectan anticuerpos anti-Sm y otros en los que sólo se detectan anticuerpos anti-Sm, por lo tanto algunos autores aceptan la existencia de anticuerpos anti-RNP/Sm, anti-RNP y anti-Sm (9).

En nuestra investigación pudimos constatar lo anterior, ya que se observó que 6 pacientes presentaron anticuerpos anti-RNP/Sm, 8 sólo anticuerpos anti-RNP y 9 sólo anti-Sm. De los 6 individuos que fueron positivos por RNP/Sm todos padecen Lupus, a los que sólo se les detectó anticuerpos anti-RNP, 6 tuvieron diagnóstico de Lupus, 1 EMTC y 1 ESP. Por último, 7 de los 9 positivos por Sm padecen Lupus y 2 SS, así con éste dato se observa nuevamente que el SS tiene también con cierta frecuencia positividad de Sm que la literatura reporta como específicos del LES.

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar los ANA, nos hacen ver que los patrones de tinción más corrientes en el grupo de pacientes que se estudió fueron el patrón homogéneo y el moteado o granular, sin embargo no encontramos ninguna relación específica de determinado anticuerpo con uno de estos patrones, e inclusive entre ambos patrones, la diferencia no es muy marcada (18 homogéneos y 16 moteados), por lo tanto no se puede decir que determinado patrón pertenece o se asocia a un ENA específico, es decir no encontramos correlación alguna entre el patrón obtenido por IFI y el ENA positivo en el ELISA.

Es importante recordar que las diferencias con respecto a lo reportado en la literatura y lo encontrado en este estudio, pueden obedecer a los métodos utilizados en cada ocasión y a las modificaciones que pueden producirse en los procesos de preparación o purificación del antígeno.

Los anticuerpos pueden detectarse con muchas diferentes técnicas y aún no existe un método ideal, la escogencia del mejor método depende de las condiciones, tiempo y tecnología de cada laboratorio, por eso al comparar los resultados no siempre estos son equivalentes (14).

REFERENCIAS

1. Bouffard P; et al. 1996. Anti-Ro (SS-A) Antibodies: Clinical significance and Biological Relevance. En: The Journal of Rheumatology 23: 1838- 1840.
2. Fonseca J; et al. 1986. Anti Ro-La en Lupus Eritematoso Sistémico.Publicación interna.
3. Hang L; et al. 1996. Clinical Laboratory Test from the Evaluation of Autoimmune Diseases. En: Lab Medica International Setiembre - Octubre: 12-17
4. Jawetz E; et al. 1985. Microbiología Médica. 2da Edición, Editorial El Manual Moderno, México, DF.
5. Juby A; et al. 1991. Specificity, Sensitivity and Diagnostic Predictive Value of Selected Laboratory Generated Autoantibody Profiles in Patients with Connective Tissue Diseases. En: The Journal of Rheumatology 18 (3): 354-358
6. Kuby J. 1991. Immunology. 2da Edición, Editorial W.H Freeman. New York.
7. Lomonte B; et al. 1995. Inmunología Manual de Laboratorio. Universidad de Costa Rica.
8. López F. 1996. Introducción. En: Revista Española de Reumatología 23 (9): 341-342.
9. López F; et al. 1996. Anticuerpos anti- U1 RNP y anti Sm. En: Revista Española de Reumatología 23 (9): 369-374.
10. Maini R; et al. 1978. Inmunología de las Enfermedades Reumáticas. 1er Edición, Editorial El Manual Moderno, México, DF.
11. Moder K. 1996. Use and Interpretation of Rheumatologic Test: A guide for Clinicians.En: Mayo Clinic; 71: 391-396.
12. Moreno A; et al. 1996. Anticuerpos anti Ro/SS-A y anti La/SS-B.En: Revista Española de Reumatología. 23 (9): 362-368.
13. Prospecto SIGMA DIAGNOSTIC ®.1993. Anti-Sm/RNP. ENA screen. Anti-SS-B. Anti SS-A Anti-dsDNA.
14. Rodríguez M; et al. 1996. Autoanticuerpos en las enfermedades Reumáticas Clasificación y Técnicas de detección. En: Revista Española de Reumatología 23 (9): 343-349.

15. Stein H; et al. 1991. Medicina Interna. 3er Edición, Editorial Salvat, México, DF.
16. Stites D; et al. 1988. Inmunología Básica y Clínica. 6ta Edición, Editorial El Manual Moderno, México DF.
17. Stites D; et al. 1993. Inmunología Básica y Clínica. 7ma Edición, Editorial El Manual Moderno, México, DF.
18. Swaak A; et al. 1993. Antinuclear antibodies in routine analysis: the relevance of putative clinical associations. En: Annals of Rheumatic Diseases 52 (2): 110-114.
19. Thorn W G. 1979. Medicina Interna. 5ta Edición, Editorial La Prensa Mexicana, México.