

35
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

PERFIL ENZIMATICO BASICO Y PERFIL
INMUNOLOGICO EN ENFERMEDADES DE TEJIDO
MUSCULAR ESQUELETICO POLIMIOSITIS Y
DERMATOMIOSITIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
PEDRO SANTOS IBARRA HERNANDEZ
VIRGINIA OLIVA HERNANDEZ PORTUGUEZ

ASESOR: O.B.P. ANTONIO SANCHEZ ORTEGA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADÉMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

Ing. Rafael Rodríguez Ceballos

Después de haberse leído y discutido el expediente de Exámenes con permisos otorgados a usted por el Sr. Excmo. Sr. TITULO de: Química Farmacéutica Biológica en colaboración con: Federico Santos Ibarra Hernández

que presenta la pasante: Virginia Ojeda Hernández Portuñuel con número de cuenta: 8026513-7 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Biológica en colaboración con: Federico Santos Ibarra Hernández

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 06 de Agosto de 1987

PRESIDENTE: Dr. Ramón Cedejas Ramírez

VOCALES: Dr. María Wila Miyazawa

SECRETARIO: Dr. P. Antonio Sánchez Ortega

PRIMER SUPLENTE: Dr. E. Patricia Campos Peña

SEGUNDO SUPLENTE: Dr. Víctor Manuel de la Cruz



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADÉMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER MORRIS
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
CALLE DE LA FERIA 100

AT: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES-CUAUTITLAN

Con base en el artículo 23 del Reglamento General de Exámenes, los permitimos consultar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
Perfil Inmunológico y Perfil Inmunotático en Enfermedades de
Músculo Muscular, Polimiositis y Dermatomiositis.

que presenta el pasante: Pedro Santos Ibarra Hernández
con número de cuenta: 3353355-7 para obtener el TITULO de:
Ingeniero Farmacéutico Biólogo ; en colaboración con :
Virginia Oliva Hernández Portuquez

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 06 de Agosto de 1997

PRESIDENTE	<u>C.F.P. Ramón Cedejas Ramírez</u>	
VOCAL	<u>C.F.P. Idalia Avila Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>C.F.P. Antonio Sánchez Ojeda</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>C.F.P. Patricia Campos Piñón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>C.F.P. Víctor M. González Juárez</u>	

Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento a mis padres Daniel Hernandez y Guadalupe Portuguez por su amor y apoyo a lo largo de mi vida y formación profesional, gracias a los cuales pude ver realizado mi sueño. Gracias Padres y perdon por hacerlo hasta ahora que ya no estan.

A cada uno de mis hermanos: Fer, Ofé, Yola, Dani, Ter, Lupita, Chay, Nomis, Esquir, Enca, Chelo y May en especial a quien ya no esta conmigo Flaco por cada una de sus palabras de aliento y apoyo durante toda mi carrera. Gracias por creer en mi.

Gracias ami Esposo Pedro Santos Ibarra por su amor y apoyo. Gracias Amor por compartir tu vida conmigo.

Virginia

*Agradesco a mis padres por haberme dado la vida
muchas Gracias.*

*A mis Abuelos Pedro Ibarra y Dolores Flores que
siempre estaran en mi corazón*

*Armando muchas gracias por tu apoyo incondicional a
lo largo de mi carrera, siempre te lo voy a agradecer*

A ti Virginia por que eres la mejor de mi vida gracias por tu amor y apoyo.

Pedro.

Dedicatoria

*A nuestros hijos Pedrito y Daniela nuestros
mas grandes tesoros.*

Agradecimientos

*A la Universidad Nacional Autonoma de México por
habernos brindado nuestra educación como profesionales.
Al Instituto Mexicano del Seguro Social, institución gracias
a la cual pudo ser posible la realizacion de este trabajo.*

A nuestros Asesores externos:

*QFB. Luis Araiza Pacheco y
QFB. Lourdes Irigoyen Coria*

Por su Disposicion y ayuda.

A nuestro Asesor interno:

*QBP. Antonio Sanchez Ortega,
asi como a nuestras sinodales:
QFB. Ramon Cendejas Ramirez
QFB. Idalia Avila Miyazawa
QFB. Patricia Campos Peon*

Mem. C. Victor M. Zendejas Buitrón

Gracias por sus contribuciones a nuestro trabajo.

í N D I C E

	Pag.
índice de Tablas y Figuras	I
Abreviaturas	II
Resumen	1
Justificación	2
Hipótesis	3
Objetivos	4
Introducción	5
I. Antecedentes Generales	
Polimiositis-Dermatomiositis.	
I.1 Definición	7
I.2 Historia	7
I.3 Frecuencia	8
I.4 Clasificación	8
I.5 Etiopatogenia	8
I.6 Cuadro Clínico	13
I.7 Diagnóstico	15
I.8 Tratamiento	16
I.9 Pronóstico	17
II. Generalidades.	
Diagnóstico por el Laboratorio	
II.1 Perfil Enzimático	18
II.1.1. Características de las Enzimas	20
II.1.2. Factores que intervienen en la velocidad de	

las reacciones enzimáticas.	21
II.1.3. Composición y Estructura.	25
II.1.4. Fundamentos de las determinaciones enzimáticas	26
II.1.5. Nomenclatura y clasificación de las enzimas	26
II.1.6. Análisis de las Enzimas	28
II.1.7. Cinética Enzimática	28
II.2. ENZIMAS MUSCULARES	
II.2.1. Creatincinasa	32
II.2.2. Aldolasa	33
II.2.3. Aspartato aminotransferasa	34
II.2.4. Alanina aminotransferasa	34
II.2.5. Lactato deshidrogenasa	35
II.3. PERFIL INMUNOLÓGICO	
II.3.1. Anticuerpos Antinucleares	36
II.3.2. Mioglobina	38
II.3.3. Proteína C Reactiva	40
II.3.4. Factor Reumatoide	43
II.3.5. Sistema de Complemento	45
III. MATERIALES Y METODOS	
III.1. Material Biológico	50
III.2. Métodos	50
III.2.1. Creatincinasa	51
III.2.2. Aspartato Aminotransferasa	52
III.2.3. Alanina Aminotransferasa	53
III.2.4. Lactato deshidrogenasa	54

III.2.5. Aldolasa	55
III.2.6. Anticuerpos antinucleares	57
III.2.7. Mioglobina	59
III.2.8. Proteina C Reactiva	60
III.2.9. Factor Reumatoide Látex	61
III.2.10. Factor Reumatoide Waller Rose	62
III.2.11. Complemento C3 y C4	64
IV. RESULTADOS	65
V. DISCUSION	74
VI. CONCLUSIONES	79
APENDICE	80
GLOSARIO DE TÉRMINOS	81
BIBLIOGRAFIA	84

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

	Pag.
Tabla I.4.1. Clasificación de la Polimiositis Dermatomiositis.	9
Tabla I.5.1. Datos de la posible asociación entre infecciones virales y Polimiositis.	11
Tabla I.7.1. Criterios de clasificación de Polimiositis y Dermatomiositis.	16
Tabla IV.1. Valores Normales de Referencia Perfil Enzimático.	65
Tabla IV.2. Valores Normales de Referencia Perfil Inmunológico.	65
Tabla IV.3. Perfil Enzimático Grupo PM-DM	66
Tabla IV.4. Perfil Enzimático Muscular	66
Tabla IV.5. Perfil Inmunológico Pruebas Cuantitativas	68
Fig. II.1.7a. Intensidad relativa de la reacción expresada en función de concentración del sustrato.	31
Fig. II.1.7b. Intensidad de la formación del producto (*) y de la desaparición del sustrato (**)	31
Fig. II.1.7c. Cambio de la concentración del producto en función de la concentración enzimática.	31
Fig. II.1.7d. Ilustración de los posibles riesgos de emplear sólo una determinación en los análisis enzimáticos	31
Fig. II.3.5a. Vías del Sistema de Complemento	49
Fig. IV.1. Perfil Enzimático en Polimiositis y Dermatomiositis	69
Fig. IV.2. Niveles Enzimáticos en Polimiositis-Dermatomiositis	70
Fig. IV.3. Perfil inmunológico en Polimiositis y Dermatomiositis	71
Fig. IV.4. Porcentajes de Patrones de Fluorescencia	72
Fig. IV.5. Diagrama de Dispersión. Niveles de CK vs Título de AAN	73

ABREVIATURAS.

AAN	Anticuerpos antinucleares
ADP	Difosfato de adenosina
ALD	Aldolasa
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Complemento
CK	Creatincinasa
DM	Dermatomiositis
E	Enzima
EMG	Electromiografia
EMTC	Enfermedad mixta de tejido conjuntivo
FR	Factor reumatoide
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
LDH	Lactato deshidrogenasa
LEG	Lupus eritematoso generalizado
NAD	Nicotinamida-adenin dinucleótido
P	Producto
PCR	Proteina C reactiva
PM	Polimiositis
S	Sustrato

RESUMEN.

Se analiza el comportamiento de los perfiles enzimático e inmunológico en un grupo de 82 pacientes que cursan con enfermedad de tejido muscular esquelético Polimiositis-Dermatomiositis diagnosticados por el servicio de reumatología del Centro Médico la Raza, determinando que las enzimas con mayor significancia clínica son la creatincinasa y la aldolasa en el perfil enzimático, detectándose como marcadores enzimáticos de daño muscular agudo. Los anticuerpos antinucleares con patrones homogéneo y moteado fino en el perfil inmunológico determinados con la técnica de inmunofluorescencia.

El complemento fue una prueba que no reveló ninguna alteración. Y se estableció que a pesar de que los anticuerpos antinucleares fué la prueba con mayor porcentaje de positividad no existe ninguna correlación del título de éstos con los niveles elevados de creatincinasa y por lo consiguiente con la actividad de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN.

La patología muscular más frecuente en la población adulta está constituida por las miopatías inflamatorias (1). En muchas de ellas conocemos su causa etiológica (bacterias, hongos, virus, sustancias tóxicas). En otras, aunque la etiopatogenia se supone, no conocemos la auténtica causa que las origina. Dentro de este segundo grupo, conocido como el de miopatías inflamatorias de causa desconocida se encuentra el complejo Polimiositis-Dermatomiositis, el cual tiene un especial interés tanto por su frecuencia como por el reto que su diagnóstico y tratamiento suponen para el clínico. Además, la Polimiositis-Dermatomiositis clasificada en enfermedades de tejido conjuntivo en la población pediátrica mexicana ocupa el segundo lugar en frecuencia (2).

HIPÓTESIS.

SI EXISTE DAÑO TISULAR Y MUSCULAR DEBIDO A UNA RESPUESTA INFLAMATORIA, ENTONCES CABE ESPERAR UNA ELEVACION ENZIMATICA DEL PERFIL DE MIOPATIAS Y ALTERACIONES EN EL PERFIL INMUNOLOGICO CORRESPONDIENTE.

OBJETIVOS.

ANALIZAR EL COMPORTAMIENTO DEL PERFIL ENZIMATICO Y EL PERFIL INMUNOLÓGICO CUANDO EXISTE DAÑO MUSCULAR DEBIDO A PROCESOS INFLAMATORIOS INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES QUE CURSAN CON ENFERMEDAD DE POLIMIOSITIS-DERMATOMIOSITIS.

DETECTAR LA ENZIMA QUE MAS SE ELEVA Y LA PRUEBA INMUNOLÓGICA MAS REPRESENTATIVA EN UN GRUPO DE PACIENTES QUE CURSEN CON POLIMIOSITIS-DERMATOMIOSITIS QUE PUDIERAN SERVIR COMO MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR Y ESTABLECER SI EXISTE CORRELACIÓN ENTRE ELLAS.

INTRODUCCIÓN

El tejido muscular esquelético dispuesto en más de 600 músculos separados, constituye el 40% de peso corporal en un adulto. La cantidad y diversidad de los padecimientos de músculo estriado son más numerosos que los signos y síntomas por los que se manifiestan clínicamente (3).

La Polimiositis (PM) y la Dermatomiositis (DM) constituyen síndromes clínicos caracterizados por miopatía inflamatoria crónica que se caracteriza clínicamente por debilidad muscular y ocurre, además, inflamación con degeneración y regeneración de las fibras musculares. Aunque puede haber afección difusa de los músculos, generalmente los grupos musculares proximales son los que primariamente se encuentran involucrados (3,4,5).

La Polimiositis y la Dermatomiositis se incluyen en el grupo de las miopatías inflamatorias idiopáticas, las cuales constituyen un grupo muy diverso de enfermedades musculares que difieren en sus manifestaciones clínicas, sus alteraciones inmunológicas y la respuesta al tratamiento. Estas diferencias sugieren que hay subgrupos de miositis idiopáticas que tienen diferentes etiologías. Sin embargo, la etiología y la patogénesis continúan siendo un enigma. Las evidencias disponibles en la actualidad señalan que la autoinmunidad juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, pero el factor o los factores que inician estas alteraciones inmunológicas se desconocen en la actualidad (3, 4, 5, 6).

Cuando es lesionado el tejido muscular, en general se produce una liberación de los componentes intracelulares hacia la circulación. El músculo contiene las enzimas aldolasa, aspartato y alanina aminotransferasas, creatincinasa y lactato deshidrogenasa entre otras, todas ellas son liberadas hacia la circulación, encontrándose por esta razón elevación de los valores de enzimas musculares. Además, debido a que el complejo PM-DM son consideradas enfermedades de naturaleza autoinmune podemos citar que las pruebas inmunológicas revelan alteraciones

de las células B y T, exceso o deficiencia de las inmunoglobulinas, anticuerpos antinucleares, factor reumatoide y alteraciones en el complemento (4, 5, 6, 7, 8).

La coexistencia de PM-DM con enfermedades de tejido conjuntivo hacen difícil su diagnóstico ya que presentan alteraciones comunes entre ellas. La necesidad de encontrar nuevos conceptos de diferenciación hacen posible el análisis en éste trabajo del comportamiento de los perfiles enzimático e inmunológico y la investigación de una posible correlación entre ambos, para poder establecer nuevos criterios que puedan tomarse en cuenta para justificar los diferentes procesos que engloban el complejo PM-DM.

I. ANTECEDENTES GENERALES

"POLIMIOSITIS-DERMATOMIOSITIS"

I.1 DEFINICIÓN.

La Polimiositis (PM) y la Dermatomiositis (DM) constituyen síndromes clínicos caracterizados por la inflamación de los músculos esqueléticos, con infiltración linfocitaria que provoca daño y degeneración de las fibras musculares (3).

I.2 HISTORIA.

- 1863 Wagner reportó una afección aguda muscular generalizada con intrincación de la piel.
- 1887 - 1891 Hepp y Unvericht (Alemania) y Jackson (USA) describen casos con mayor debilidad crónica de músculo con o sin intrincación de la piel. Unvericht usó el término Dermatomiositis. Asentó el involucramiento del músculo proximal y reportó recuperación espontánea de un caso.
- 1899 - 1903 Oppenheim describió intrincación ocular y del músculo cardíaco. Gowers inventó el término Polimiositis. Steiner describió 28 casos de la literatura, incluyendo el ataque a infantes.
- 1950 - 1960 Se introdujeron los corticoesteroides para la terapia.
- 1958 Walton y Adams intentaron la primera clasificación clínica.
- 1966 Banker y Victor mostraron que la Dermatomiositis infantil es probablemente una entidad distinta.
- 1975 Bohan y Peter describieron otra clasificación ahora ampliamente aceptada.
- 1980 Primera descripción por Nishikai y Reichlin de un anticuerpo, el anti Jo-1 con especificidad de la enfermedad.
- 1983 El antígeno Jo-1 se identificó por Matthews y Bernstein como una enzima llamada tRNA-histidil sintetasa.

I.3 FRECUENCIA.

La PM-DM tiene una frecuencia anual de cerca de siete casos por millón de habitantes. No existe relación con el nivel socioeconómico o el sitio geográfico. La distribución según la edad es bimodal, con una pequeña cima entre los 10 y 14 años y una cima mayor alrededor de los 50. Los pacientes con miositis asociada con trastorno maligno tiene una edad promedio poco mayor de 60 años: en tanto que aquellos con síndrome de traslapamiento tiene una edad promedio de cerca de 35 años. En la Polimiositis del adulto existen dos veces más casos en mujeres que en hombres (9).

I.4 CLASIFICACION.

Existen varios intentos de clasificación de estas miopatías inflamatorias; la que se ha utilizado más ampliamente en los últimos años es la propuesta por Bohan y Peter que dividen a los grupos de acuerdo a sus características clínicas, a la respuesta terapéutica e incluso de acuerdo al pronóstico, lo que permite una guía adecuada para su estudio. Los grupos de clasificación indicados por estos autores se describen en la tabla I.4.1 (10).

I.5 ETIOPATOGENIA.

No existe un agente etiológico de la PM-DM. Como en otras enfermedades inflamatorias vasculares de tejido conjuntivo de etiología desconocida. La mayoría de los investigadores aducen diversos mecanismos de daño tisular (5).

TABLA I.4.1
CLASIFICACIÓN DE LA POLIMIOSITIS-DERMATOMIOSITIS

- GRUPO I: Polimiositis primaria idiopática
 - GRUPO II: Dermatomiositis primaria idiopática
 - GRUPO III: Dermatomiositis o polimiositis asociada a neoplasias.
 - GRUPO IV: Dermatomiositis o polimiositis infantil asociada con vasculitis.
 - GRUPO V: Dermatomiositis o polimiositis asociada con enfermedades del tejido conjuntivo.
-

Bohan A, Peter JB, 1975. (Ref. No. 10)

Se ha postulado que es posible que uno o más agentes exógenos se localicen en el músculo, lo que ocasionaría una reacción inmunopatológica continua. Los candidatos patogénicos más probables son los virus de acuerdo a evidencias indirectas aportadas por diversos investigadores (Tabla I.5.1) y en particular virus del grupo Coxackie B. En éste sentido se ha informado sobre evidencia epidemiológica que relaciona infecciones agudas por Coxackie B en la infancia con pericarditis y miocarditis, la presencia de anticuerpos antivirales, y evidencia experimental de la inducción de miositis y miocarditis por el virus Coxackie B-1 y B-3 en diversas cepas de ratones (11,12,13). Además hay evidencia ultraestructural de infección viral persistente en biopsias musculares de pacientes con Polimiositis (14).

Sin embargo, estos informes no se confirman con el aislamiento del virus y por otra parte, también se ha aislado partículas similares a virus en piezas de autopsia de músculo normal (15).

Otros virus que se han implicado en la patogenia de la PM-DM son los grupos myxovirus y picornavirus, sin resultados concluyentes (5).

Además de los virus, otros factores se han asociado al daño tisular como es la presencia de títulos elevados de anticuerpos antitoxoplasma; estas observaciones no son concluyentes ya que la elevación en los títulos de los anticuerpos pueden ser consecuencia de la reactividad inmunológica inespecífica (4, 5, 6, 9).

TABLA I.5.1
DATOS DE LA POSIBLE ASOCIACION ENTRE INFECCIONES VIRALES Y
POLIMIOSITIS

1. Informes clínicos de polimiositis posterior a infecciones virales agudas.
 2. Hallazgos sugerentes mediante microscopía electrónica en biopsias musculares de pacientes con PM-DM.
 3. Anticuerpos antivirales.
 4. Modelos experimentales de miositis inducida por virus.
-

Dennis AM, 1984 (Ref. No. 16)

La ingestión de ciertas drogas pueden inducir síntomas los cuales imitan la miositis. Estas incluyen la penicilamina, hidralazina, penicilina y toxifeno. La cesación de la terapia invariablemente dirige a una regresión en la enfermedad muscular (5, 6).

Se ha mostrado que en la PM-DM hay alteraciones tanto de la respuesta inmune humoral, como de la respuesta inmune celular, con claro dominio de esta última como causante de daño muscular. Las alteraciones de la inmunidad humoral se manifiestan por la presencia de diversos anticuerpos antinucleares. Los reportes de la prevalencia de anticuerpos antinucleares han variado de acuerdo al sustrato que ha sido usado (5, 6, 8).

La sensibilidad diagnóstica de estos anticuerpos es baja, de tal manera que son de poco valor para excluir el diagnóstico pero pueden ser útiles para definir poblaciones de pacientes con mayor precisión, para definir subgrupos clínicos, pronósticos y probablemente respuestas a tratamiento. Un buen número de autoanticuerpos han sido recientemente identificados en el suero de pacientes con miositis, y podemos citar entre los más importantes los anticuerpos PM-1, Mi, Ku y los anti-Jo-1 que es considerado el más específico de la enfermedad y el mejor estudiado de estos marcadores más recientemente identificados (5, 6).

Las investigaciones de autoanticuerpos contra componentes musculares no han brindado resultados concluyentes. Se han encontrado anticuerpos antimióglobina y anticuerpos antimiosina, pero estos anticuerpos no son específicos para PM-DM. La concentración de inmunoglobinas es habitualmente normal; se han informado casos aislados de PM-DM en presencia de hipogamaglobulinemia y no hay evidencia de reducción de los niveles de complemento en forma consistente (5, 6)

Por otra parte existen varios datos que apoyan la participación de la inmunidad celular en la patogenia de estas enfermedades (17). Se tienen informes de la disminución de la actividad del factor tímico sérico en pacientes con Dermatomiositis inactiva, lo cual puede explicar la alteración de la inmunidad celular informada en estos pacientes (18). Los linfocitos de sangre periférica de pacientes con Polimiositis pueden ser citotóxicos para cultivos de células musculares y pueden producir linfocinas en respuesta a la incubación con músculo autólogo (6, 9).

La composición de los infiltrados mononucleares en músculo de pacientes con PM, estudiada mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, muestra que la mayoría de los linfocitos son células T activas (19).

Los subgrupos de células T demuestran un infiltrado mixto de células de ayuda (CD-4) y de células supresoras citotóxicas (CD-8), con las células CD-8 positivas invadiendo las fibras musculares; y en menor número células citotóxicas naturales, macrófagos y linfocitos B. También se tienen datos en los que las poblaciones linfocitarias que constituyen los infiltrados de pacientes diagnosticados con Dermatomiositis presentan un predominio de linfocitos B en todos los infiltrados (endomiocial, perivascular o perimisial), aunque esto era más relevante en los infiltrados perivasculares. En conjunto, estos datos sugieren una participación importante en la inmunidad celular en la patogenia de la PM-DM (20).

En el caso de DM se ha descrito que el daño vascular puede tener un importante papel patogénico. Mediante microscopia

electrónica se han localizado diversas alteraciones en los capilares de músculo esquelético, principalmente en las células endoteliales, y se ha encontrado importante disminución de la relación entre el número de capilares y el de fibras musculares. Se ha comprobado que existe una relación significativa entre la patología capilar y la patología muscular en los pacientes clínicamente diagnosticados de dermatomiositis, mientras que en los pacientes con diagnóstico clínico de Polimiositis y junto a una importante patología muscular, los vasos eran normales en su mayoría sin que existiera relación alguna entre los dos parámetros estudiados (21).

Por otra parte, hay varias líneas de investigación que sugieren que los factores genéticos tienen un factor importante en la susceptibilidad para desarrollar una miopatía inflamatoria idiopática. Los haplotipos HLA-B8 y DR3 son más frecuentes en pacientes de raza blanca con miositis que en la población general y el desarrollo de anticuerpos contra la sintetasa de aminoacil del RNA t en estos pacientes parece estar también genéticamente determinado (22, 23).

1.6 CUADRO CLÍNICO.

La polimiositis se presenta en forma de debilidad de la musculatura proximal, en más de dos tercios de los pacientes. En general progresa de manera lenta e insidiosa a lo largo de varios meses, y acostumbra a iniciarse en la cintura pelviana con dificultad para bajar o subir escaleras; poco después se afecta la cintura escapular y el enfermo puede tener dificultad para levantar los brazos y peinarse. La participación de la musculatura cervical puede evidenciarse por la imposibilidad de mantener la cabeza erguida y la de la musculatura faríngea por un trastorno de la deglución de carácter mixto. Algunos pacientes presentan dolor a la palpación muscular (15-20%) pero la atrofia no puede evidenciarse hasta fases tardías sin que existan nunca fasciculaciones. Excepcionalmente este mismo cuadro clínico adopta un carácter agudo o subagudo. Además de la musculatura,

participa en un 20% de los pacientes el sistema articular en forma de artralgias especialmente manos, muñecas y rodillas. En la forma de tipo V asociadas a otras colagenosis se describen lesiones articulares similares al lupus, o a la artritis reumatoide (3, 4, 5, 6, 9).

La participación cardíaca subclínica detectada por electrocardiograma y ecografía es común, pero sólo un 5% de los pacientes presentan manifestaciones de insuficiencia cardíaca debido a una miocardiopatía en la que predominan los fenómenos necróticos sobre los inflamatorios (3, 6, 9).

Aunque se han descrito casos de lesión renal y algunos enfermos evidencian fenómeno de Raynaud, ello suele ocurrir esencialmente en las formas de tipo V (4, 9).

La Dermatomiositis, se caracteriza por acompañar a las manifestaciones descritas por Polimiositis, una erupción eritematosa especialmente visible en la parte superior del torax, frente, cuello, hombros y antebrazo. Este eritema es a veces pruriginoso, a veces escamatoso y otras descamativo y se acompaña en algunos casos de una pigmentación violácea periorbitaria, que si está presente es muy característica. Además, en las manos, especialmente en el dorso de los dedos, pueden aparecer nódulos inflamatorios violáceos (pápulas de Gottron) y telangiectasias periungueales. En los casos de lesión cutánea marcada es más común la asociación a enfermedades de colágeno tipo V (3, 4, 5, 6, 9).

Las formas asociadas a tumores malignos, cuya presencia debe investigarse siempre en especial en mayores de 60 años, se observa en uno de cada diez enfermos con Polimiositis y en uno de cada seis con Dermatomiositis. En estas circunstancias la distribución se equipara. Los tumores malignos más frecuentes son los broncopulmonares y los de mama y con menor frecuencia de ovario y de estómago. El síndrome puede remitir definitivamente con la curación de la neoplasia, hecho que es poco común (4, 9).

La miositis infantil se acompaña frecuentemente con lesiones isquémicas en intestino, riñón y sistema nervioso. Sin embargo, la evolución es favorable con prolongada supervivencia (3, 4, 5).

La dermatomiositis que se asocia a otras colagenosis especialmente el lupus, la artritis reumatoide y la esclerodermia combinan la participación muscular y cutánea con las lesiones viscerales y los hallazgos inmunológicos propios. En general, La evolución es más grave que en las formas puras (3, 4).

La evolución de las formas primarias es variable, en las formas agudas puede producirse fallecimiento por infecciones intercurrentes. En las formas crónicas la supervivencia a los 5 años es de 80%, siendo la causa fundamental de muerte la insuficiencia cardíaca (4, 9).

I.7 DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de PM-DM ofrece pocos problemas cuando las manifestaciones clínicas son características y hay alteraciones de laboratorio, de gabinete y cambios compatibles en la biopsia muscular. Es útil referirse a los criterios de clasificación propuestos para el diagnóstico, descritos en la tabla I.7.1. De acuerdo a ellos el diagnóstico de DM o PM es definido cuando se satisfacen los cuatro criterios y es probable con tres de ellos. Como en todos los casos en que se proponen criterios diagnósticos los cuales son particularmente útiles para asegurar que los estudios clínicos y terapéuticos sean homogéneos (5).

La mayoría de las pruebas de laboratorio de rutina son normales, excepto por elevación de velocidad de sedimentación globular; en algunos casos puede haber leucocitosis. El factor reumatoide es positivo en aproximadamente 40% de los casos y los anticuerpos antinucleares en más del 50% (inmunofluorescencia). Los cambios en los niveles séricos de creatinina (CK) correlacionan estrechamente con la evolución clínica, pero se han encontrado normales en un número limitado de pacientes sin que esto descarte el diagnóstico. En los casos de Dermatomiositis con los niveles normales de CK la evolución es en general más grave, asociándose neoplasias y fibrosis pulmonar (3,4,5,6).

TABLA 1.7.1

CRITERIOS DE CLASIFICACION DE POLIMIOSITIS DERMATOMIOSITIS

1. Debilidad muscular proximal, habitualmente simétrica, de inicio incidiioso, con o sin mialgias con o sin manifestaciones cutáneas.
2. Aumento de la actividad de enzimas musculares en suero.
3. Hallazgos característicos de la biopsia muscular. Evidencia histológica de necrosis de las fibras musculares, regeneración e infiltrado celular mononuclear.
4. Cambios electromiográficos multifocales de miopatía.

Bohan A, Peter JB, Bowman RL, 1977. (Ref. No. 24)

También se aumentan otras enzimas de origen muscular como las aminotransferasas, aldolasa y la lactato deshidrogenasa (LDH). Y aunque todos son datos bioquímicos útiles, podemos citar que los niveles de CK son los más sensibles (3, 4, 5, 6).

La mayoría de los pacientes tienen alteraciones en la electro miografía (EMG) pero el estudio puede ser normal hasta en un 10% (3, 5, 9).

La biopsia muscular muestra cambios compatibles en 90% de los pacientes que tienen los criterios clínicos, bioquímicos y de EMG; sin embargo, la biopsia confirma la naturaleza inflamatoria de la miopatía en sólo el 75% de los casos (5, 9).

I.8 TRATAMIENTO.

A pesar de la falta de pruebas terapéuticas controladas en forma adecuada, los corticoesteroides en general se aceptan como el fármaco de elección. Se administran 50 a 100 mg de prednisona al día con dosis divididas y se continúa hasta que ocurra mejoría clara. Las enzimas séricas disminuyen a la mitad de las cifras anteriores al tratamiento un mes después de iniciar la terapéutica y alcanzan cifras normales en dos a tres meses. La fuerza muscular suele mostrar clara mejoría en dos meses. Los

intentos de reducir rápidamente la dosis de esteroides o suspender el tratamiento en fase prematura conduce a recurrencia de la enfermedad. Puede intentarse la dosis diaria única o el tratamiento esteroide en días alternados para reducir los efectos secundarios, pero esto deberá intentarse sólo cuando la enfermedad esté bien controlada. El tratamiento de sostén es necesario durante años en muchos casos. La falta de respuesta a los esteroides sucede en cerca de 20% de los pacientes. Los inmunosupresores, como metotrexato, azatioprina o ciclofosfamida, o la plasmaféresis son útiles pero no se dispone de estudios controlados que validen su eficacia. La Polimiositis asociada con transtorno maligno en ocasiones muestra una remisión impresionante al extirpar el tumor (6, 9).

1.9 PRONÓSTICO.

Existen varios estudios que analizan la sobrevida en PM-DM y los factores que pueden influir en el pronóstico. En ocho series analizadas de 1947 a 1986, se encuentra un porcentaje promedio de mortalidad de 29.2% en general a 5 años. (25, 26).

Los factores que pueden influir negativamente en el pronóstico son: los pacientes de mayor edad al momento del diagnóstico (más de 45 años), la presencia de neoplasias, la afección cardíaca y la disfagia. Además, una de las series destaca como factores de riesgo para inducir remisión, la presencia de leucocitosis y la fiebre persistente (5).

Las causas más comunes de muerte en estos pacientes son: complicaciones pulmonares, cardiovasculares, septicemias y neoplasias (3, 5).

II. GENERALIDADES DIAGNOSTICO POR EL LABORATORIO

II.1 PERFIL ENZIMATICO.

Cualquiera que sea su origen biológico, la célula debe llevar a cabo todas las reacciones fisicoquímicas complejas indispensables para la conservación de la vida, en un orden estricto, con una regulación estrecha, a una velocidad altísima y con la mayor eficacia. A pesar de las considerables modificaciones químicas que se producen en las moléculas de las fuentes de energía de la célula, estos fenómenos deben tener lugar en condiciones relativamente uniformes, pues los grandes cambios de temperatura, presión y pH son perjudiciales para la materia viva. Además la célula debe transmitir con suma exactitud a sus descendientes, durante muchas generaciones, instrucciones completas para los menores detalles de los fenómenos vitales con planos minuciosos para toda la maquinaria celular (27).

En química inorgánica, se conocen muchos ejemplos de reacciones que resultan muy lentas o no tienen lugar si no son facilitadas por la presencia de un elemento o compuesto que no interviene en la reacción, ni es consumido o modificado durante esta, pero puede facilitar o acelerar la combinación de los reactivos. Estos compuestos o reactivos se llaman catalizadores. Para satisfacer las rigurosas condiciones de la química celular que acabamos de mencionar, se necesitan catalizadores biológicos especiales llamados enzimas. Las enzimas se pueden definir como proteínas especiales, producidas solamente por células vivas,

susceptibles, solas o combinadas con varios factores no proteínicos, de acelerar y regular de forma sumamente específica los fenómenos químicos de la vida (27).

Las enzimas catalizadoras orgánicas responsables de la mayoría de las reacciones químicas que suceden en el organismo, se encuentran en todos los tejidos. Algunos se han identificado en el plasma o en el suero, al que llegan desde las células dañadas o quizás incluso desde las células intactas. El interés de los clínicos por las enzimas séricas empezó hace más de medio siglo, con la demostración de la utilidad de los niveles de la fosfatasa alcalina en el diagnóstico de las enfermedades óseas y hepatobiliares, de los niveles de la fosfatasa ácida en el diagnóstico del carcinoma de próstata y de los niveles de amilasa y lipasa en el diagnóstico de las pancreopatías. Pese a la utilidad clínica de estos parámetros en la enfermedad y a la demostración de un número determinado de otras enzimas séricas durante los siguientes 25 años, el interés clínico de la enzimología sérica se mantuvo en un relativo letargo hasta 1953. La demostración en ese año de la aspartato aminotransferasa (AST) en el suero de individuos normales y las observaciones subsiguientes de que el aumento de los niveles de esta enzima eran útiles en el diagnóstico de las enfermedades cardíacas y hepáticas condujeron a una acentuada intensificación del interés por la enzimología (28).

II.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS.

a). Todas las enzimas son proteínas y muestran las propiedades químicas y físicas generales de estos compuestos, como inestabilidad frente a calor o radiación (28, 29).

b). Muchas enzimas exigen la presencia de un cofactor no proteínico. Este cofactor puede ser un molécula inorgánica sencilla, o un ion metálico, en cuyo caso se habla de "activadores". Muchos cofactores son compuestos orgánicos complejos, que reciben el nombre de coenzimas. Llevan a cabo varias funciones en las reacciones enzimáticas: aceptación del hidrógeno liberado por una deshidrogenasa, transporte de electrones, y transporte de grupos fosfato, acilo u otros. Algunas coenzimas se encuentran firmemente unidas a la enzima, y aunque sus funciones sean semejantes a las de otras enzimas, reciben el nombre de grupos prostéticos, lo que significa que representan herramientas de la enzima (28, 29).

c). Las reacciones enzimáticas son reversibles; el sentido de la reacción depende de las condiciones en la célula. Estas reacciones reversibles alcanzan muchas veces un estado de equilibrio en el cual se encuentran presentes todos los reactivos (28, 29).

d). Es común decir que las enzimas son sumamente específicas; o sea su actividad sólo se refiere a un sustrato en particular. En realidad, la especificidad absoluta de una enzima para un sustrato es la excepción, y no la regla. La mayor parte de enzimas tienen una especificidad funcional. Una variedad de

especificidad enzimática se relaciona probablemente con la relación tridimensional que existe entre las configuraciones moleculares de la enzima y el sustrato. En estos, la enzima sólo ataca un miembro de un par de isómeros estéricos, que difieren solamente por la disposición de sus átomos, siendo idénticos en otros aspectos (28, 29, 30).

e). Cuando una enzima dada es producida por varios tejidos del cuerpo, es posible demostrar ciertas diferencias, mediante electroforesis y otras técnicas; por ejemplo, la lactato deshidrogenasa (LDH) producida por el músculo cardíaco difiere en ciertos aspectos como sensibilidad de calor, movilidad electroforética, de la LDH que existe en el hígado y otros tejidos. Un grupo de enzimas con las mismas características principales en cuanto a función, pero que difieren por su movilidad electroforética o comportamiento cromatográfico, constituye un conjunto de isoenzimas (28, 29).

II.1.2 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA VELOCIDAD DE LAS REACCIONES ENZIMATICAS.

TEMPERATURA.

Como en otras reacciones químicas, el aumento de temperatura, elevando la actividad molecular y la frecuencia de los choques entre moléculas, acelera las reacciones enzimáticas. Entre ciertos límites de temperatura, dicho aumento es casi lineal; pero si la temperatura sigue subiendo la desnaturalización de la proteína que constituye la enzima se

acompaña de inactivación rápida, y disminuye la velocidad de reacción (28, 29, 30).

EFEECTO DEL pH.

Precisamente por ser proteínas, los cambios del pH afectan de manera notable el carácter iónico de los grupos amino y carboxílico de las enzimas, lo cual a su vez modifica marcadamente el sitio catalítico y, en general su conformación. Los valores bajos o altos de pH, además de producir efectos puramente iónicos, pueden determinar una desnaturalización considerable que también conduce a la inactivación enzimática, probablemente estos son los efectos principales que determinan la relación típica enzimas-pH (28, 29, 30).

En los estudios enzimáticos es muy importante establecer, desde el principio de la investigación, el pH óptimo y los límites de actividad hacia uno u otro lado. Es muy importante el control del pH en varias partes de la célula, porque si no se mantiene su estabilidad, se producen cambios en las velocidades de reacción enzimáticas. Esto causaría serios trastorno en los sistemas catabólicos y anabólicos que forman un íntimo engranaje en la célula (30).

CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO.

En un sistema que contenga una cantidad fija de enzima, se observa que la velocidad de la reacción química producida aumenta al añadir sustrato. Al aumentar la concentración de moléculas de sustrato, son ocupados números progresivamente mayores de focos

activos sobre las moléculas enzimáticas. Cuando todos los focos están cubiertos, la enzima funciona a velocidad máxima, y un nuevo aumento de concentración de sustrato no acelerará ya la reacción (28, 29, 30).

La influencia de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática no siempre recibe la atención que merece, como lo demuestra la publicación de técnicas en las cuales la cantidad de sustrato es insuficiente para garantizar la saturación de la enzima. La consecuencia de este error es que parece cambiar la actividad a lo largo de la reacción (28).

CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA.

En términos generales, la velocidad de la reacción química producida es directamente proporcional a la concentración de la enzima. En la célula, esta regla no siempre se sigue estrechamente, por la localización de cierta enzima en determinadas partículas; la actividad enzimática puede verse afectada por la capacidad del sustrato para llegar a estas partículas (28, 29, 30).

PRESENCIA DE ACTIVADORES E INHIBIDORES.

Muchas enzimas necesitan la presencia de iones específicos, y existen cada día más pruebas de la enorme influencia que ejercen ciertos elementos sobre la actividad enzimática. La presencia de magnesio es indispensable para la actividad completa de la fosfatasa alcalina; la de zinc, para la deshidrogenasa láctica. Los sistemas de ensayo deben contener estos iones

esenciales. Inversamente, se conocen muchos ejemplos de inhibición específica de una enzima; por ejemplo, el cianuro impide que el grupo porfirina de hierro de la oxidasa reaccione con el oxígeno. Los grupos sulfhidrilo de muchas enzimas quedan bloqueados al combinarse con iones de metales pesados como mercurio, plomo y cobre (28).

ACTIVADORES. Las sustancias que se denominan activadores incrementan la velocidad de una reacción enzimática. En general los activadores son moléculas o iones pequeños, por ejemplo iones metálicos. Un mecanismo de acción de los activadores es proporcionar un sitio activo electropositivo que atrae los grupos con carga negativa del sustrato. Otros activadores tienen función estructural y ayudan a estabilizar la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima. Sin importar su mecanismo, es necesario que los activadores estén presentes para aquellas enzimas que lo requieran, con el fin de que la actividad enzimática sea óptima. Las coenzimas son similares a los activadores, ya que algunas enzimas requieren que estas moléculas orgánicas estén presentes para que su actividad enzimática sea completa. Las coenzimas como NAD y NADP actúan como aceptores de electrones o donadores en reacciones de deshidrogenasa y funcionan más como un segundo sustrato que como activadores (29).

INHIBIDORES. En contraste con los activadores, ciertas sustancias actúan como ya se mencionó inhibiendo selectivamente la acción de determinadas enzimas. Estas sustancias se denominan inhibidores competitivos y no competitivos. Los inhibidores competitivos son similares a la molécula de sustrato normal y compiten con ella para enlazarse con el sitio activo de una enzima específica. La inhibición competitiva se invierte incrementando la concentración del sustrato. A medida que hay más sustrato disponible hay mayor probabilidad de que se enlace con el sitio activo de la enzima en vez del inhibidor. Algunos ejemplos de inhibidores competitivos incluyen fármacos

terapéuticos como sulfonamidas y otras sustancias que actúan como análogos del sustrato e inhiben reacciones enzimáticas en los microorganismos (29, 30).

La inhibición no competitiva se produce cuando una sustancia se enlaza con la enzima en un sitio distinto al sitio activo; este enlace provoca cambio de configuración en la estructura enzimática alterando el sitio activo que deja de ser receptivo al sustrato. La inhibición no competitiva es reversible o irreversible, según el tipo de enlace que se forme. Cuando el inhibidor se enlaza con la enzima mediante uniones débiles, la inhibición es reversible. Como el sitio activo del enzima ya no puede unirse con el sustrato, es imposible contrarrestar la inhibición no competitiva aumentando la concentración del sustrato. Algunos ejemplos de inhibidores no competitivos son los iones de metales pesados como el plomo y el mercurio. Otros inhibidores que se encuentran en el laboratorio y en ocasiones interfieren con los análisis enzimáticos incluyen detergentes que contaminan el material del vidrio (29, 30).

II.1.3 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA.

Todas las enzimas son proteínas, es decir, compuestos de alto peso molecular, generalmente entre 13 000 y 500 000 Daltons; contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, en cantidades similares a las halladas en otras proteínas. Su hidrólisis con ácidos fuertes produce una mezcla de aminoácidos y pequeños péptidos. Las enzimas se distinguen de otras proteínas que no los son por su actividad catalítica, generalmente muy específica para los materiales para los cuales actúan. El comportamiento catalítico de una enzima es dependiente de las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de la molécula proteica. Cambios en cualquiera de estas estructuras pueden afectar la actividad enzimática de la proteína (30).

II.1.4. FUNDAMENTO DE LAS DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

Las enzimas se determinan por su actividad más que en función de su concentración, puesto que existen en cantidades muy pequeñas en los líquidos biológicos y tienen una gran semejanza química. La actividad enzimática se expresa en unidades que habitualmente representan una de las siguientes cosas:

- 1). El aumento de uno de los productos.
- 2). El descenso en la concentración del sustrato.
- 3). El índice de cambio en la concentración de coenzimas.

La tasa de cambio de cualquiera de estos constituye una medida del índice de reacción (27).

Los métodos inmunoquímicos para la determinación de los niveles de enzimas no han encontrado aplicación clínica. Hasta el momento, los métodos de ensayo para la determinación de niveles de las isoenzimas de la LDH, CPK, fosfatasa alcalina y pepsinógeno en los que se utilizan antisueros específicos sólo presentan interés para métodos de investigación (27).

II.1.5. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS.

Los fundamentos del nuevo sistema son los siguientes:

La base del nombre de la enzima es la reacción global que cataliza.

Cada enzima se designa en forma específica por un número de código con cuatro elementos. El primer número del código coloca a la enzima en uno de los siguientes seis grupos principales:

1. Oxidoreductasas.
2. Transferasas.
3. Hidrolasas.
4. Liasas.
5. Isomerasas.
6. Ligasas.

Las oxidoreductasas son enzimas que catalizan reacciones de oxidorreducción; los ejemplos más comunes son los deshidrogenasas. Las transferasas catalizan el paso de un grupo químico de una sustancia a otra; el ejemplo más común es la aspartato aminotransferasa. Las hidrolasas son enzimas de

hidrólisis, que desdoblan un sustrato, por ejemplo un éster, introduciendo en su estructura los componentes del agua; ejemplo de ellas es la acetil colinesterasa. Las liasas restan grupos a los sustratos, pero sin hidrólisis dejando dobles enlaces en la estructura molecular del producto; como por ejemplo de este grupo se puede citar las descarboxilasas, entre otras, la descarboxilasa de piruvato. Las isomerasas catalizan rearrreglos intramoleculares del sustrato. Un representante típico de este grupo cataliza la transformación mutua de 3-fosfato de gliceraldehído y fosfato de dihidroxiacetona. Las ligasas catalizan la unión entre dos moléculas; con rotura simultánea de un enlace pirofosfato en el trifosfato de adenocina o un compuesto similar. Este grupo no contiene ningún enzima utilizada en clínica (27, 28).

El segundo número del código suministra una información más específica acerca de la enzima. Por ejemplo en el grupo de las transferasas este número indica la naturaleza del grupo que se transfiere (28).

El tercer número del código suministra más detalle acerca, por ejemplo, del tipo de molécula aceptora para una oxidoreductasa, o de la indole química exacta del grupo manejado por una tranferasa (28).

El siguiente índice es el número de serie de la enzima en la clase indicada por el tercer número. Por ejemplo una enzima cuyo número de código sea 2.6.1.2, forma parte del grupo 2, el de las tranferasas. El 6 indica que el tipo de grupo transferido contiene nitrógeno. El tercer número, 1, significa que dicho grupo, que contiene nitrógeno, es un grupo amino. El 2 final nos dice que ésta enzima es el segundo miembro de la clase transferasas del grupo amino. El nombre sistemático sería: aminotransferasa de L-alanina:2-oxoglutarato. Como nombre común se recomienda el de aminotranferasa de alanina (28).

Se puede considerar una enzima de la siguiente manera:

HALOENZIMA = APOENZIMA + COENZIMA

La apoenzima es la porción protéica sujeta a desnaturalización, como a todas las proteínas. Ésta desnaturalización, debida a agentes físicos y químicos, se asocia con una pérdida de actividad enzimática (27, 29).

La coenzima es la porción dializable y es un tipo de sustrato esencial en la actividad catalítica. Está estrechamente ligada a la enzima y ciertamente no es una proteína. El NAD (nicotinamida-adenindinucleótido) es un ejemplo de coenzima (27, 29).

II.1.6 ANALISIS DE LAS ENZIMAS.

El análisis de las enzimas se lleva a cabo mediante el uso de diferentes métodos. Los dos métodos más comunmente empleados son los de una sola determinación a tiempo fijo denominados métodos de punto final, y los de varias determinaciones a tiempos fijos, llamados métodos cinéticos (29).

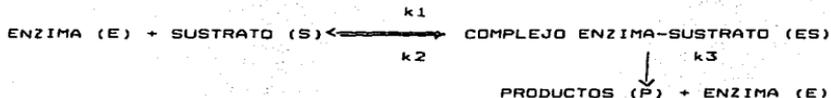
Los métodos de punto final son empleados para ensayos que deben alcanzar un estado de equilibrio o punto de estado fijo, es decir, ensayos que miden la cantidad de una variable analítica una vez que no se produce ninguna reacción aparente (29).

En el método cinético la velocidad de reacción se sigue continuamente, o con el empleo de muchos puntos, en función del tiempo. Generalmente el tiempo de reacción es breve, es decir, de algunos segundos o pocos minutos y existe poco peligro de degradación enzimática. Método cinético es una denominación utilizada a menudo para designar un seguimiento continuo de progreso de la reacción (29).

II.1.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA.

Aunque una reacción enzimática representa unos mecanismos muy complejos que no son plenamente entendidos, puede establecerse que constituye un complejo transitorio o reversible con su sustrato. Los grupos funcionales de coenzimas o grupos prostéticos, o bien ambos, pueden desempeñar un papel en la formación del complejo enzima-sustrato. Éste complejo se

descompone en la enzima y el producto. La enzima no se altera en el transcurso de toda la reacción. La hipótesis de Michaelis-Menten describe esta secuencia de acontecimientos según se indica a continuación:



(k_1, k_2, k_3 = constante de intensidad) (27).

Esta teoría establece además que, añadiendo una elevada concentración de sustrato, con la gran participación de un complejo intermediario enzima-sustrato, la intensidad de conversión del sustrato en los productos de la reacción está determinada por la velocidad de conversión del complejo enzima-sustrato en los productos de la reacción. Se expresan mejor las unidades de actividad enzimática en términos de la intensidad de la reacción catalizada. La intensidad de la reacción puede considerarse gráficamente (figs. II.1.7a y II.1.7b). En la figura II.1.7a la velocidad relativa de reacción se expresa en función de la concentración del sustrato (S). A baja concentración, la velocidad es de primer orden con respecto a (S). La velocidad es de orden cero a elevada concentración, independientemente de (S). Para determinar la actividad enzimática se deberá emplear esta parte de la curva (27).

La reacción enzimática de primer orden es aquella en que la velocidad de reacción depende tanto de la concentración del sustrato como de enzima. Por consiguiente, la velocidad de reacción se modifica continuamente según el tiempo a medida que se consume el sustrato, lo que dificulta la determinación de la actividad enzimática (27).

En la reacción enzimática de orden cero, la velocidad de reacción es lineal según el tiempo, con independencia de la

En una prueba enzimática se puede determinar la actividad como P (producto en aumento) o bien S (sustrato en disminución) según cual sea analíticamente más conveniente (fig. II.1.7b). A menudo el producto o sustrato tiene color y, si esto es así, se puede determinar cuantitativamente mediante colorimetría o espectrofotometría (27).

Una enzima ejerce su máxima influencia cuando la concentración de sustrato sea más elevada y la concentración del producto nula. Éste es el caso que sucede más probablemente al comienzo de la reacción, cuando la intensidad se describe como de orden cero con respecto al sustrato, seguida de una disminución progresiva de la velocidad de la reacción, a medida que se alcanza el equilibrio. La intensidad de la reacción de orden cero significa en éste caso simplemente que ésta intensidad es constante e independiente del sustrato y de las concentraciones del producto. Si la reacción es de orden cero, la concentración del producto aumentará linealmente con respecto al tiempo (Fig. II.1.7b). De manera ideal, se realizan las pruebas enzimáticas en condiciones que permitan que la reacción se aproxime al orden cero con respecto al producto y al sustrato durante la totalidad del periodo de determinación. Se registran en la prueba determinaciones múltiples del sustrato o de la concentración del producto en función del tiempo (27).

La figura II.1.7d ilustra los riesgos potenciales de utilizar una simple determinación. Con un sistema de medición simple o de punto único, la misma actividad aparente estaría dada por tres tipos de reacciones diferentes (27).

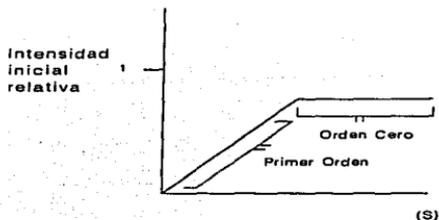


Fig II. 1.7a. Intensidad relativa de la reacción, expresada en función de la concentración del sustrato.

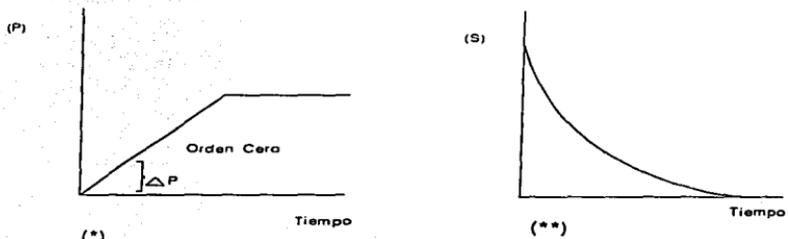


Fig II. 1.7b Intensidad de la formación de producto (*) y de la desaparición del sustrato (**)

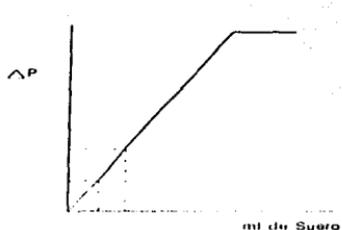


Fig II.1.7c. Cambio en la concentración del producto ΔP en función de la concentración enzimática

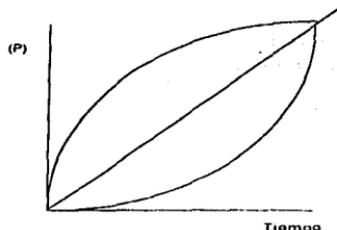


Fig II.1.7d. Ilustración de los posibles riesgos de emplear sólo una determinación en los análisis enzimáticos

II.2. ENZIMAS MUSCULARES.

II.2.1. CREATINCINASA.

La hidrólisis enzimática del fosfato de creatina y la transferencia del fosfato de alta energía hacia el difosfato de adenosina fue descubierta en el comienzo de la década de 1930. La reacción catalizada reversible es la siguiente:



La enzima que participa en esta reacción es conocida con el nombre de creatincinasa. Previamente conocida como creatina fosfoquinasa (31).

La creatincinasa se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos. Su función consiste en la regeneración del ATP, especialmente en los sistemas contráctiles y de transporte. En el músculo, esta enzima representa un 10-20% del peso/volumen de las proteínas citoplasmáticas. Posee un peso molecular de 81000 daltons y es un dímero. Existen tres isoenzimas: MM (músculo) MB (híbrida en el corazón) y BB (cerebro). La tabla II.2.1. ilustra las variaciones de la composición de los diversos tipos tisulares (7,27).

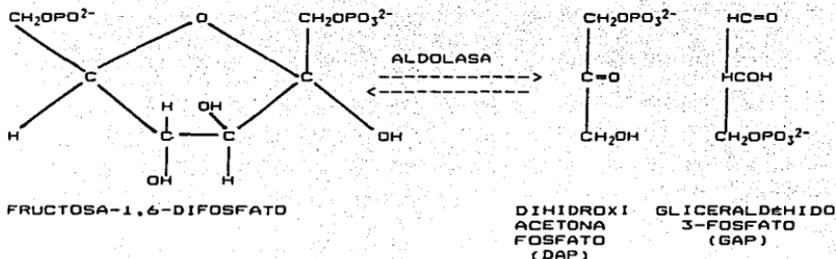
TABLA II.2.1.
ACTIVIDAD DE LA CRETINCINASA Y DISTRIBUCION DE LAS ISOENZIMAS EN
LOS TEJIDOS.

TEJIDOS	ACTIVIDAD DE LA CK (U/g. de tejido húmedo)	MM	MB	BB
		% Actividad Total		
Músculo Esqueletico	2000-3200	>93	0-5	0
Corazón	400	78	22	0
Cerebro	160	0	0	100
Próstata	10	4	4	92
útero	50	2	1	97
Riñón	13	12	0	88
Hígado	4	90	6	4

[Jung, B, h1976. (Ref.No.31)]

II.2.2. ALDOLASA.

Es una enzima del grupo de las liasas. Su efecto es la degradación irreversible del sustrato en dos compuestos sin hidrólisis. La aldolasa cataliza la siguiente reacción:



La aldolasa es una enzima significativa en el ciclo glucolítico y se encuentra en todas las células vivas. En los tejidos en los que la glucólisis proporciona una gran parte de la energía requerida, es posible encontrar una actividad elevada de aldolasa. Por ejemplo, alrededor de 300 mg de músculo esquelético contiene tanta aldolasa como la que se encuentra en el volumen sanguíneo circulante normal. Las aldolasas del difosfato de fructosa se encuentran presentes en diferentes formas isoenzimáticas. Las tres formas principales son la aldolasa A, predominante en el músculo; la aldolasa B, en el hígado y la aldolasa C, en el cerebro. Las tres aldolasas contienen cuatro subunidades polipeptídicas, las cuales difieren en su composición de aminoácidos (7, 27, 29).

II.2.3. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST).

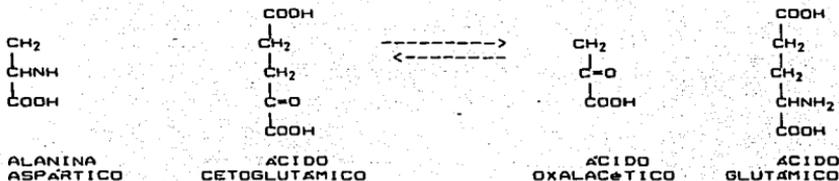
Comúnmente llamada transaminasa glutámico oxalacética (TGO). Las transaminasas catalizan la transferencia de un grupo -amino desde un aminoácido hacia un -cetoácido. La aspartato aminotransferasa cataliza la reacción siguiente:



Todos los tejidos contienen aspartato aminotransferasa, particularmente el corazón, hígado y músculo esquelético. Existen dos isoenzimas, una mitocondrial (m-AST) y la otra citosólica (c-AST). Estas dos isoenzimas difieren notablemente en cuanto a su estructura y a sus propiedades químicas y físicas; sin embargo, ambas catalizan la misma reacción y solamente existen pequeñas diferencias en los pasos catalíticos (7, 27, 29).

II.2.4. ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT).

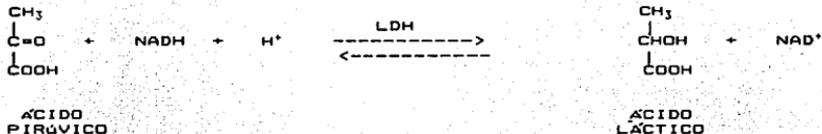
Esta enzima cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al ácido -ceto glutámico:



La alanina aminotransferasa (ALT) también se encuentra presente en todos los tejidos y su aparición en el suero es un índice de lesión tisular similar a la aparición de AST. Sin embargo los valores séricos de ALT son más pronunciados en las lesiones hepáticas que en las lesiones miocárdicas y esta enzima es un indicador más específico de lesión hepática (7, 27, 29).

11.2.5. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).

La LDH cataliza la transferencia de dos electrones y de un hidrógeno del lactato al NAD:



El lactato se forma a partir del piruvato producido por el ciclo glucolítico cuando la cantidad de oxígeno es limitante, como sucede en el músculo durante la actividad intensa. En el caso de lesiones tisulares provocadas por traumatismos o enfermedad, la lactato deshidrogenasa aparece en el suero y es posible detectar su presencia a través de su capacidad de catalizar la reacción precedente (7, 27, 29).

La LDH es un tetramero formado por cuatro cadenas de polipéptidos. Cada cadena puede ser de dos tipos: cardíaca H o muscular M. Las combinaciones de estas subunidades producen cualquiera de las siguientes isoenzimas: LD1 (HHHH), LD2 (HHHM), LD3 (HHMM), LD4 (HMMM) y LD5 (MMMM). La LDH es una enzima citoplásmica omnipresente que se encuentra en casi todas las células del cuerpo y presenta mayor actividad en cerebro, eritrocitos, leucocitos, riñón, hígado, pulmón, miocardio, plaquetas y músculo esquelético, por lo cual es muy inespecífica (29).

11.3. PERFIL INMUNOLOGICO

11.3.1. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

La identificación de antígenos intracelulares por autoanticuerpos específicos permite establecer perfiles de respuesta autoinmune útiles en el diagnóstico clínico. La respuesta inmune contra proteínas asociadas a ácidos nucleicos podría deberse al aumento del estímulo antigénico provocado por las necesidades fisiológicas de moléculas de gran actividad, la neutralización de sus funciones, las cuales son importantes para la sobrevivencia celular y que podría generar en un ciclo continuo alteraciones de tipo autoinmune (32, 33, 34).

El término de anticuerpos antinucleares es aplicado al conjunto de autoanticuerpos con una reactividad más o menos definida al material nuclear. Estos anticuerpos se encuentran asociados a diferentes enfermedades autoinmunes con cierta prevalencia, llegando a ser específicos de la misma. Actualmente se tienen definidas las características moleculares de los autoantígenos y su función celular de algunos de ellos. Las técnicas de laboratorio actuales (inmunofluorescencia, doble inmunodifusión, ELISA) permiten detectar con facilidad el AAN en pacientes con sospecha de enfermedad de tejido conectivo. Una prueba negativa no incluye la posibilidad de que se pueda tratar de Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y deben considerarse los anticuerpos anti-SSA (Ro) y/o anti-SSB (La). La presencia de diferentes patrones en la inmunofluorescencia puede indicar la especificidad del autoanticuerpo; los títulos menores de 1:20 se consideran negativos, entre 1:20 - 1:60 son títulos que se observan en artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes, los títulos mayores de 1:320 están asociados a LEG (32, 33, 34).

Han sido descritos seis patrones morfológicos de tinción inmunofluorescente, cuatro de los cuales poseen significado clínico (B).

A). Patrón Homogéneo. Es la expresión morfológica de anticuerpos antihistona y ocurre en pacientes con lupus

eritematosos sistémico o por fármacos. En este patrón, el núcleo muestra tinción uniforme y difusa.

B). Patrón Periférico. Es la expresión morfológica de los anticuerpos para el anti-DNA-ds y anticuerpos para las nucleoproteínas solubles. Es característico del enfermo con LES activo.

C). Patrón Moteado. Refleja la presencia de anticuerpos dirigidos contra constituyentes nucleares diferentes del DNA. Los antígenos contra los cuales están dirigidos estos anticuerpos, pueden extraerse del núcleo usando solución salina. El análisis anti-ENA (antígeno nuclear extraíble) identifica a los anticuerpos contra dos antígenos nucleares que pueden extraerse, el antígeno Sm (Smith) y el antígeno RNP (ribonucleoproteína. Los anticuerpos contra el antígeno Sm son característicos de LES, mientras que los títulos altos de anticuerpos anti-RNP son característicos de la enfermedad mixta de tejido conectivo.

D). Patrón Nucleolar. Es causado por la tinción homogénea de nucleolos. Se ha sugerido que este antígeno puede ser el precursor ribosómico de las ribonucleoproteínas. Este patrón se asocia con bastante frecuencia a la esclerodermia o a la Polimiositis-Dermatomiositis (8).

Todos los patrones de tinción nuclear deben ser interpretados cautelosamente por las razones siguientes: (1) el suero de un paciente con enfermedad de la colágena vascular puede contener muchos anticuerpos para diferentes constituyentes del núcleo, de manera que un patrón homogéneo puede oscurecer un patrón nucleolar o moteado; (2) diferentes anticuerpos en el suero pueden hallarse presentes a títulos distintos, de manera que si se diluye el suero, se puede cambiar el patrón observado; (3) la estabilidad de los diversos antígenos es diferente y puede ser cambiada mediante la fijación o la desnaturalización, y (4) el patrón observado parece estar influido por los tipos de tejidos o células empleados como sustrato para la prueba (8).

FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS AUTOANTIGENOS.

Actualmente se conocen las funciones biológicas de algunos autoantígenos: los antígenos Sm y RNP (LEG, EMTC) participan en la maduración del RNA mensajero especialmente en la eliminación de secuencias no leíbles y poliadenilación del RNA. En la transcripción del RNA mensajero y ribosomal participa la DNA topoisomerasa I (esclerosos generalizada progresiva); el anticuerpo anti-Sci-70 precipita con un producto de degradación de 70 000 Da de DNA topoisomerasa I. En la transcripción de RNA ribosomal, la enzima nuclear RNA polimerasa I, compuesta de un complejo de 13 subunidades. La inhibición en la síntesis de proteínas a nivel de la aminoacilación puede llevarse a cabo a través de un anticuerpo presente en la Polimiositis, el cual reacciona con las sintetetas de histidina, treonil y alanina (32, 33, 34).

Los criterios clínicos y las pruebas de laboratorio para la detección y manejo de la información concerniente a los AAN, así como el conocer su función biológica, nos permite acercarnos a nuevos límites para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de padecimientos autoinmunes.

II.3.2 MIOGLOBINA.

La mioglobina es una proteína globular pequeña, de peso molecular de 17000 D, tiene conformación tridimensional, de longitud de onda de 3.6 nm, constituida por una sola cadena polipeptídica, con 153 aminoácidos, contiene un grupo hemoferroporfirínico, o un grupo hemo, experimenta oxigenación y desoxigenación reversible, muestra homología con la hemoglobina de adulto, ambas experimentan la unión de oxígeno reversiblemente a sus grupos hemo, la primera en el músculo y la segunda en los eritrocitos. No solamente actúa almacenando oxígeno, sino que también aumenta la velocidad de difusión del oxígeno a través de la célula, es un pigmento intracelular (rojo) presente en vertebrados e invertebrados. La mioglobina es mucho más soluble que la hemoglobina. Esto, unido a su menor tamaño de partícula

que la hemoglobina. Esto, unido a su menor tamaño de partícula hace que pueda atravesar las membranas glomerulares del riñón más fácilmente que la hemoglobina y explica una aparición en la orina después de traumatismos musculares intensos. Enlaza oxígeno más firmemente que la hemoglobina y así procura oxígeno a los tejidos a presión reducida (35,36).

La distinción entre hemoglobinuria y mioglobinuria es difícil. En ambos casos, la orina es roja o parda y se observan algunas células en el sedimento. Se encuentran cilindros pigmentados que pueden tener un color marrón obscuro y contener mioglobina (27).

La tira reactiva para detectar sangre da un resultado positivo tanto con la hemoglobina como con la mioglobina. Si puede analizarse el suero, se observará a menudo un color rosa en los casos de hemoglobinemia, pero su color normal cuando existe mioglobinemia, ya que este pigmento es depurado con rapidez. Ninguna de las pruebas cualitativas es satisfactoria para distinguir entre mioglobina y hemoglobina; ambos pigmentos pueden aparecer después de aplastamiento (27).

Las pruebas inmunoquímicas con antisueros frente a la mioglobina humana requieren una mioglobina humana estándar precedente del músculo o la orina que contenga mioglobina y un antisuero que no dé lugar a reacciones cruzadas con la hemoglobina. El antígeno de la mioglobina no es muy estable, pero a pesar de ello, estas pruebas son específicas, por lo cual son las más recomendables. Existen también métodos de punto final y de tasa nefelométrica (27).

Cuando se produce una destrucción brusca de las fibras musculares (rhabdomiólisis), se libera mioglobina, que se elimina rápidamente de la sangre y se excreta por la orina como ya se mencionó. El pH urinario ácido afecta la estabilidad de la mioglobina, por lo que la muestra debe ser neutralizada y refrigerada a la mayor brevedad. La mioglobina parece ser más tóxica para el riñón que la hemoglobina (27).

Entre las causas más conocidas de mioglobinemia podemos señalar: La Polimiositis-Dermatomiositis, traumatismos e

isquemia, lesiones de músculo esquelético, cirugía, ejercicio fuerte, lesión de músculo cardíaco, convulsiones de cualquier causa, infecciones (influenza, virus del herpes, etc), sustancias tóxicas y fármacos (exceso alcohólico agudo, fenciclidina), causas hereditarias como Paroxística Meyer-Betz, deficiencia en fosforilasa (8, 27).

11.3.3 PROTEÍNA C REACTIVA.

En el presente siglo no existían antimicrobianos eficaces, la neumonía neumocócica era temible y prácticamente sin remedio; muchos estudios se orientan a los aspectos diagnósticos y terapéuticos de la serología de esa enfermedad. No fue casualidad entonces que Tillet y Francis describieran una reacción de precipitación entre el suero de enfermos neumónicos y el carbónhidrato somático (C) de la cápsula de neumococos (37).

La proteína C reactiva, se consideró un componente proteico del suero, reactivo con el polisacárido somático C del neumococo. Pronto se definió que no se trataba de un anticuerpo, y años después se demostró que no se trataba de una reacción específica ni siquiera característica de la neumonía neumocócica. La PCR aparecía en todos los casos donde existía un proceso necrosante, inflamatorio, infeccioso o no y se correlacionó entonces su presencia con la duración de la inflamación. Así se determinó que el aumento de PCR en suero se asocia con infecciones bacterianas agudas, necrosis o daño tisular isquémico, traumático o tumoral (37).

ESTRUCTURA

La PCR es una proteína presente en el suero normal en cantidades ínfimas, su molécula tiene estructura pentagonal, con subunidades unidas en forma no covalente tiene un peso molecular de 120-140 KDa y migra en electroforesis dentro de la fracción gammaglobulina (37).

FUNCION

La PCR es un "reactante de fase aguda". Cuando hay daño tisular e inflamación en un animal homotérmico sea por infección, trauma o neoplasia, la concentración de muchas proteínas

plasmáticas cambia. Algunas aumentan notoriamente su concentración como es el caso de PCR, el componente P de amiloide, la proteína sérica A de amiloide, el fibrinógeno, C₉ e inhibidores de proteasas. La concentración de otras se reduce: prealbúmina, albúmina, transferrina, globulinas transportadoras (37).

Estos cambios en la composición de plasma se conocen en conjunto como "reacción de fase aguda" y se traduce además por aceleración en la velocidad de sedimentación globular (37).

La PCR eleva su concentración unas 1000 veces durante la fase aguda. La PCR funciona como un ligando multiespecífico a través de dos sitios distintos pero interactivos de reacción molecular: uno que requiere calcio iónico se une a fosforilcolina y tal vez a otros fosfolípidos con gran afinidad; reconoce también residuos galactosil con menor fuerza de unión e incluso reconoce polianiones como DNA. El otro sitio, calcio independiente, se une a policationes. En virtud de esos sitios la PCR tiene posibilidades de unirse a muchas estructuras químicas presentes en bacterias, hongos, parásitos y en estructuras propias como fosfolípidos de la membrana de eritrocitos y otras células. Así la PCR funciona como opsonina, activa plaquetas y se deposita en sitios de daño tisular. Por otro lado el complejo PCR fosforilcolina se une C₁ (vía clásica) y puede contribuir a la generación de inflamación. También se sabe que los linfocitos T como receptor Fc gamma (supresores) fijan PCR (37).

Aunque en individuos normales solo una mínima proporción de linfocitos tiene PCR en su membrana, el número y la distribución de células con PCR se expande en el curso de la fiebre reumática activa, donde linfocitos T, B y nulos son positivos para PCR unida a la membrana. No se conocen con precisión las consecuencias de este hecho (37).

La PCR es un producto de síntesis de los hepatocitos, y la señal que inicia sus síntesis es mediada por la interleucina 1, una proteína de peso molecular de 15 kDa generada por macrófagos activados, que también tiene acciones como pirógeno y activa linfocitos T (37).

Se sabe que la PCR se une a la membrana celular dañada en sitios de inflamación o necrosis, y tal vez favorezca la actividad de C, fagocitosis e incluso citólisis. Recientemente se encontró que la reacción de exocitos de plaquetas, que liberan enzimas lisosomales, pueden ocurrir por mediación de la PCR. En suma, si bien las funciones de la PCR no han sido aclaradas, se conoce que: reconoce y se une a ligandos presentes en microorganismos o en células autólogas modificadas por daño tisular; activa al menos un sistema pro inflamatorio plasmático, el complemento; puede además reaccionar con células fagocíticas, plaquetas y células linfoides y por tanto es muy probable que tenga participación en la patogénesis de la inflamación, y tal vez, acciones sobre la inmunoregulación (37).

USO EN LA CLINICA

La detección de la PCR en el suero tiene interés clínico. Se ha utilizado como prueba para identificar enfermedad orgánica, y en caso de ser positiva se acepta como evidencia de un estado inflamatorio o de necrosis tisular. Su determinación secuencial revela que al resolverse el daño tisular se reduce el nivel sérico de la PCR y por tanto señala su utilidad como elemento de seguimiento clínico, en muchas situaciones, entre las que se encuentran las enfermedades reumáticas (37).

La PCR aumenta también en el curso de infecciones bacterianas, y por experiencia se ha observado que la actividad lúpica se acompaña de PCR detectable en suero. En la artritis reumatoide la ausencia de PCR en el suero acompaña a la remisión clínica. En la fase reumática el seguimiento de la PCR sérica guarda correlación clínica confiable con la actividad o no de la enfermedad (37).

II.3.4 FACTOR REUMATOIDE.

Las gammaglobulinas con actividad antigammaglobulina se han llamado desde hace tiempo factor reumatoide (FR) por su presencia en el suero de más de 80% de los afectados de artritis reumatoide. Sin embargo se hallan de ordinario en cantidades significativas en cierto número de otras enfermedades caracterizadas a menudo por hipergammaglobulinemia, así como en un porcentaje apreciable de individuos de edad avanzada asintomáticos (27).

Primero debemos definir exactamente qué entendemos por factor reumatoide. Las inmunoglobulinas altamente purificadas no sólo débilmente inmunogénicas, particularmente en la misma especie. Las observaciones de que el suero de muchos pacientes con artritis reumatoide aglutinan eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos de conejo antieritrocitos de carnero (prueba de Waller-Rose) conduce al hallazgo de que una fijación similar en el suero de la artritis reumatoide a gammaglobulina humana agregada por calor y cubierta por partículas inertes como gotas de látex o bentonita provocaba la aglutinación o floculación (respectivamente) de las últimas. Se encontró que el factor responsable del suero se encontraba en una gammaglobulina IgM, que puede ser cuantificada mediante dilución seriada del suero problema. Anteriormente los observadores creían que el factor reumatoide reaccionaba con determinantes antigénicos únicos descubiertos o formados cuando las gammaglobulinas normales eran alteradas por factores exógenos, posiblemente una infección. De ello se originaba una especie de autoinmunidad. Nuevos hallazgos han sugerido que la situación es mucho más compleja (27, 28).

Aunque la producción de FR puede ser inducida por gammaglobulina autóloga exógenamente alterada, el factor reumatoide usual reacciona con determinantes hallados tanto en la IgG nativa como en la agregada. La reactividad con la forma agregada es más probable debido a los puntos antigénicos multivalentes aparecidos durante el proceso de agregación. En efecto la presencia de IgG normal (no agregada) en el suero problema puede inhibir en ensayos en cierto grado, por

competición, la fijación de IgG reactiva agregada al factor reumatoide en el mismo espécimen (27).

El factor puede encontrarse en cualquier clase de inmunoglobulina; la mayoría de los métodos clínicos reflejan la cantidad de FR IgM debido a la mayor eficacia de las moléculas pentavalentes de IgM en las reacciones de aglutinación. El FR de las clases IgG, IgA, e IgE son más difíciles de analizar y aún no se sabe con seguridad su significado diagnóstico (27).

El FR hallado en la artritis reumatoide y en los estados crónicos infeccioso-inflamatorios son generalmente policlonales. De todos modos, se pueden encontrar factor reumatoide monoclonales en las paraproteínas encontradas en el mieloma múltiple, en las macroglobulinemias de Waldenstrom, en la púrpura hiperglobulinémica y en ciertos estados linfoproliferativos. Un FR reactivo forma crioprecipitados mixtos con IgG nativa. Se encuentra en algunos pacientes con LES, síndrome de Sjögren y mononucleosis infecciosa, y en el síndrome de la crioglobulinemia mixta que se presenta en vasculitis, artritis, y con frecuencia, glomerulonefritis progresiva (8, 27).

El Fr es producido activamente en el sinovial de las articulaciones afectadas. Esta presente, junto con la IgG, en los neutrófilos y a veces en los complejos crioprecipitados, en el líquido articular inflamatorio (8, 27).

El significado patogénico del FR esta todavía en fase de discusión. Algunos han especulado acerca de que el factor reumatoide puede tener un papel protector al promover la limpieza fagocítica de los complejos inmunitarios circulantes. Algunos FR reaccionan con el componente nuclear, además de hacerlo con la IgG. Los niveles séricos de FR son normales con algunos enfermos con AR clásica. Algunos autores han sugerido que el FR puede constituir un mecanismo protector abortivo y que los niveles altos encontrados en la artritis reumatoide grave o con mal pronóstico reflejan un proceso patogénico muy potente en el cual la producción de FR es la respuesta. Sin embargo, es concebible que en estos pacientes los grandes complejos IgG-IgM sean patogénicos (27).

II.3.5. SISTEMA DE COMPLEMENTO.

El sistema de complemento (C) es el mediador humoral primero de las reacciones antígeno-anticuerpo. Consiste en cuando menos 20 proteínas plasmáticas química e inmunológicamente distintas capaces de actuar de manera recíproca una con otra, con el anticuerpo y con las membranas celulares. Después de la activación del sistema, estas alteraciones conducen a la generación de una actividad biológica que oscila desde la lisis de una variedad de diferentes clases de células, bacterias y virus, hasta la mediación directa de los procesos inflamatorios. Además, el complemento está capacitado para reclutar otros sistemas efectores humorales y celulares y conseguir la participación de ellos. Induciendo la liberación de histamina de las células cebadas, la emigración dirigida de los leucocitos, la fagocitosis y la liberación de los constituyentes lisosómicos de los fagocitos (8).

Las proteínas individuales de este sistema se encuentran normalmente en la circulación como moléculas precursoras inactivas. En conjunto, ellas comprenden alrededor de 15% (p/p) de la fracción globulínica de plasma. Las moléculas precursoras nativas se designan con símbolos numéricos: C1, C2, C3, etc..o, en el caso de ciertos componentes, por símbolos o nombres triviales: properdina, factor B, factor D, etc. Cada componente debe ser activado sucesivamente en condiciones apropiadas para que progrese una reacción de complemento. Por lo tanto la activación no constituye un evento único, sino más bien un proceso dinámico que permite a las proteínas volverse miembro de un sistema funcional integrado, en el cual actúan recíprocamente. Las enzimas del complemento, formadas durante el proceso de activación se designan por una barra horizontal colocada sobre el símbolo del componente; por ejemplo, C1s, factor B. Un estado biológicamente activo de algún componente enzimático, también puede ser identificado por una barra horizontal colocada sobre el número del componente, por ejemplo, C5b, 6, 7. Los fragmentos de los componentes que se originan a partir del desdoblamiento

enzimático son denotados por letras que siguen a la designación empleada para el componente, por ejemplo, C4a, C4b (8, 27).

Hay dos mecanismos paralelos, o vías pero totalmente independientes que conducen a la activación de la porción terminal, biológicamente importante, de la serie de reacciones del complemento. Estos mecanismos de activación denominados las vías clásica y alternativa o de la properidina, respectivamente, son desencadenados por sustancias diferentes. Cada una consta de diversas reacciones. Las dos vías de activación convergen en el punto medio del sistema del complemento y el resto de la serie de reacciones, que implica las reacciones de C5 hasta C9, es común para ambas vías. La porción terminal de la serie de reacciones del complemento puede también ser activada de manera directa por ciertas enzimas séricas y celulares no pertenecientes a él, sin la participación de los factores reaccionantes iniciales. Entre las enzimas semejantes a la tripsina, capaces de activar la etapa C3 o C5 de la reacción, están la enzima fibrinolítica plasmina y ciertas enzimas lisosómicas (8, 27).

CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO.

Se ha demostrado que el complemento es capaz de medir la destrucción lítica de muchas clases de células, incluyendo eritrocitos, plaquetas, bacterias, virus que poseen una cubierta de lipoproteínas y linfocitos, aunque con grados muy variados de eficacia en cada circunstancia. Cualquiera de las dos vías de complemento puede producir daño celular citolítico. Algunas especies del complemento son más eficaces en la producción de lisis de ciertas combinaciones de células-anticuerpos. Algunas células son bastante resistentes a la destrucción por el complemento, aun en presencia de activación marcada del complemento en la superficie celular. Hay muchas razones por las cuales puede fallar el complemento para lisar las células, incluyendo la presencia de modulación antigénica, un fenómeno por el cual el anticuerpo altera la distribución del antígeno sobre la superficie celular o produce una disposición espacial de sitios antigénicos que no facilitan la activación del complemento

en una región de la membrana susceptible a la lisis. La falta de sitios de fijación para los últimos componentes reaccionantes del complemento es otra posible causa de insuficiencia del mismo para lisar una célula. No obstante, más comúnmente el complemento falla y no produce lisis debido a la naturaleza y estructura de la pared celular o de la membrana, o debido a que la célula repara el daño mediado por el complemento. Se puede necesitar factores adicionales al complemento, como en la lisis de bacterias gram negativas (8, 27).

A medida que los componentes libres del complemento en el suero se adhieren a las superficies de las células y de otras membranas biológicas, ocurren cambios en la ultraestructura de la membrana como: Acumulación del conjunto de proteínas del complemento; Cambios en el medio y la carga de la membrana como; Modificación de las propiedades y funciones de la membrana; Estimulación de la función celular; Lesiones e hinchamiento de la membrana; Daño o desintegración de la membrana (8, 27).

SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO.

La evidencia sobre la importancia biológica de este sistema en las defensas del huésped ha provenido de los estudios de varias enfermedades experimentalmente inducidas en los animales, de enfermedades inmunitarias humanas y del aumento marcado de la susceptibilidad a la infección que caracteriza algunas deficiencias congénitas o adquiridas de los componentes del complemento o de los reguladores del complemento en el humano. Estas enfermedades muestran ciertas características que implican la participación del complemento. Estas incluyen una depresión en las concentraciones circulantes de los componentes del complemento depositados en el sitio de daño histico y la infiltración por leucocitos polimorfonucleares. En los animales ha sido posible definir más el papel patógeno del complemento en ciertas enfermedades. Uno de los ejemplos más notables es la enfermedad experimental denominada nefritis nefrotóxica que es inducida por la inyección, en una animal, de un anticuerpo dirigido contra la membrana basal glomerular. El anticuerpo

inyectado rápidamente se fija a la membrana basal glomerular y el resultado es la lesión estructural y funcional inmediata. La inserción de los anticuerpos va seguida rápidamente por la activación del complemento, la cual se refleja en un descenso en las concentraciones circulantes y por la fijación de los componentes del complemento a la membrana basal glomerular, donde pueden ser puestos de manifiesto por las técnicas de fluorescencia. Aparece con rapidez una afluencia de polimorfonucleares, seguida por la destrucción de la membrana basal glomerular y proteinuria, que son consecuencias de la liberación de enzimas degradantes que provienen de los leucocitos. El papel esencial del complemento para producir la afluencia de leucocitos y facilitar su localización es demostrado por el hecho de que la infiltración y el daño histico son impedidos si el anticuerpo se vuelve primero incapaz de fijar el complemento o si el animal es empobrecido en C3. Mecanismos semejantes participan en el componente inflamatorio de numerosas enfermedades humanas, incluyendo diversos tipos de glomerulonefritis, artritis reumatoide, anemias hemolíticas autoinmunitarias y otras. Los estudios metabólicos con componentes del complemento radiactivamente marcados han documentado y medido la actividad del complemento en estas y otras enfermedades (8).

VIAS DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO

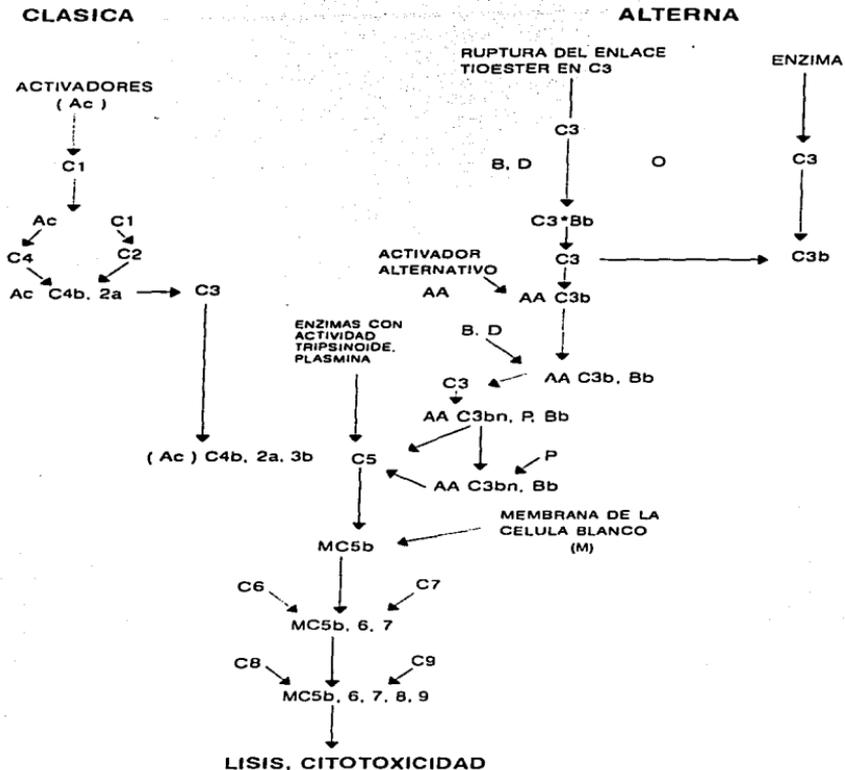


Fig. II. 3.5a. Diagrama de los mecanismos de acción en cadena del sistema de complemento (C). (P=Properdina; B=Factor B; D= Factor D).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se emplearon 82 sueros de pacientes con Polimiositis-Dermatomiositis diagnosticados por el servicio de reumatología del Centro Médico la Raza, para lo cual se usó el criterio de Bohan y Peter. Todos los pacientes tenían debilidad de músculo proximal y por lo menos dos de los tres criterios siguientes:

- 1) Aumento de la actividad de las enzimas musculares en suero.
- 2) Anormalidades características del electromiograma.
- 3) Hallazgos característicos en la biopsia.

Como controles se utilizaron 132 sueros de personas aparentemente sanas donados por el Banco de Sangre del Centro Médico la Raza, 87 hombres y 47 mujeres de edad entre 18-54 años.

III.2 MÉTODOS.

PERFIL ENZIMÁTICO.

DETERMINACIÓN DE CK, AST, ALT, LDH

MÉTODO: AUTOMATIZACIÓN
EXPRESS 550

DETERMINACIÓN DE ALDOLASA

MÉTODO: BOSENHERZ G.
COLEMAN J.II

PERFIL INMUNOLÓGICO.

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (AAN)

MÉTODO: IFI HEP-2

MIOGLOBINA

MÉTODO: LATEX

PROTEÍNA C REACTIVA (PCR)

MÉTODO: LATEX

FACTOR REUMATOIDE (FR)

MÉTODO: LATEX

WALLER-ROSE

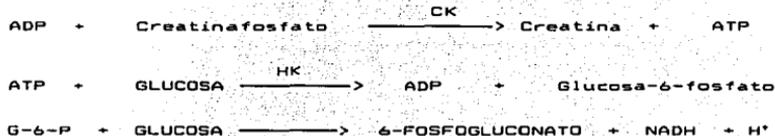
COMPLEMENTO (C3 Y C4)

MÉTODO: INMUNODIFUSIÓN
RADIAL.

III.2.1. CREATINCINASA (CK)

FUNDAMENTO

Basado en una modificación de la metodología de Szasz y Col.



PREPARACIÓN.

Se reconstituye el reactivo de CK con 7 ml de agua destilada. El reactivo preparado es estable por 8 hrs. a temperatura ambiente (18-25°C) o por 5 días en refrigeración (2-8°C).

DEFINICIONES DE LOS PARÁMETROS DE LA PRUEBA.

Tipo de Prueba: Cinética
Tipo de Curva: lineal enzimática
Unidades: U/L

Longitud de Onda Primaria: 340 nm

Longitud de Onda Secundaria: 380 nm

Factor 4212

No. de calibradores: 1

No. de Repeticiones: 2

Límite Bajo del blanco: 0.000

Límite Alto del blanco: 0.650

límite Bajo A: 0.0000

Límite Alto A: 1.8000

Bajo Normal: 26

Alto Normal: 174

Límite de linealidad: 1500

DEFINICIONES DE LOS REACTIVOS DE LA PRUEBA

REACTIVO: 1

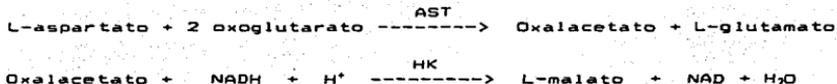
Volumen del reactivo: 260 ul

Código de Barras: CK1A Intervalo de Lectura: 120 segundos.

III.2.2. ASPARTATO AMINO TRANSFERASA (AST)

FUNDAMENTO

Basado en una modificación de el método propuesto por la IFCC.



PREPARACIÓN.

Se reconstituye el reactivo de AST con 7 ml de agua destilada. Preparado el reactivo es estable por 8 hrs. a temperatura ambiente (18-25°C) o por 4 días en refrigeración (2-8°C).

DEFINICIONES DE LOS PARAMETROS DE LA PRUEBA.

Tipo de Prueba: Cinética
Tipo de Curva: lineal enzimática
Unidades: U/L
Longitud de Onda Primaria: 340 nm
Longitud de Onda Secundaria: 380 nm
Factor -2206
No. de calibradores: 1
No. de Repeticiones: 2
Límite Bajo del blanco: 0.800 Límite Alto del blanco: 2.000
Límite Bajo A: 0.7000 Límite Alto A: 2.0000
Bajo Normal: 12 Alto Normal: 32
Límite de linealidad: 700

DEFINICIONES DE LOS REACTIVOS DE LA PRUEBA

REACTIVO: 1

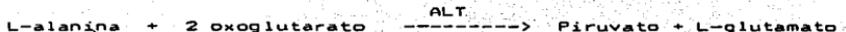
Volumen del reactivo: 250 ul

Código de Barras: AS1A Intervalo de Lectura: 60 segundos.

III.2.3. ALANINA AMINO TRANSFERASA (ALT)

FUNDAMENTO

Basado en una modificación de la metodología de la IFCC.



PREPARACIÓN.

Se reconstituye el reactivo de ALT con 7 ml de agua destilada.
El reactivo preparado es estable por 8 hrs. a temperatura ambiente (18-25°C) o por 4 días en refrigeración (2-8°C).

DEFINICIONES DE LOS PARÁMETROS DE LA PRUEBA.

Tipo de Prueba: Cinética
Tipo de Curva: lineal enzimática
Unidades: U/L
Longitud de Onda Primaria: 340 nm
Longitud de Onda Secundaria: 380 nm
Factor -2206
No. de calibradores: 1
No. de Repeticiones: 2
Límite Bajo del blanco: 0.800
límite Bajo A: 0.7000
Bajo Normal: 4
Límite de linealidad: 700

Límite Alto del blanco: 2.000
Límite Alto A: 2.0000
Alto Normal: 36

DEFINICIONES DE LOS REACTIVOS DE LA PRUEBA

REACTIVO: 1

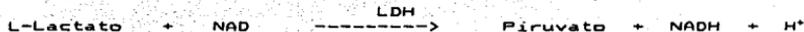
Volumen del reactivo: 250 ul

Código de Barras: ALIA Intervalo de Lectura: 60 segundos.

III.2.4. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

FUNDAMENTO

Basado en una modificación de el método de Waker y Col.



PREPARACIÓN.

Se reconstituye el reactivo de LDH-L con 7 ml de agua destilada. Preparado el reactivo es estable por 8 hrs. a temperatura ambiente (18-25°C) o por 5 días en refrigeración (2-8°C).

DEFINICIONES DE LOS PARÁMETROS DE LA PRUEBA.

Tipo de Prueba: Cinética
Tipo de Curva: lineal enzimática
Unidades: U/L
Longitud de Onda Primaria: 340 nm
Longitud de Onda Secundaria: 380 nm
Factor 4212
No. de calibradores: 1
No. de Repeticiones: 2
Límite Bajo del blanco: 0.000 Límite Alto del blanco: 0.800
límite Bajo A: 0.000 Límite Alto A: 1.400
Bajo Normal: 89 Alto Normal: 221
Límite de linealidad: 1200

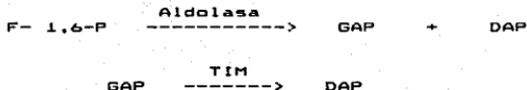
DEFINICIONES DE LOS REACTIVOS DE LA PRUEBA

REACTIVO: 1
Volumen del reactivo: 260 ul
Código de Barras: LD1A Intervalo de Lectura: 40 segundos.

III.2.5. ALDOLASA

FUNDAMENTO

Basado en el método de Bolsenherz. G y Cols. (1953).



MATERIAL Y EQUIPO

1. Gradilla
2. Tubos de ensaye de 13x100
3. Pipetas serológicas de 0.05, 0.01, 0.2 y 5 ml.
4. Baño María
5. Espectrofotómetro Coleman Junior II
6. Cubetas de 1 cm de paso de luz
7. Solución de cloruro de sodio 0.9%
8. test de Aldolasa que contiene:

Reactivos:

- 1 Tampon/Sustrato
- 2 NADH
- 3 GDH/TIM/LDH

OBTENCION Y ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES.

- 1 Llevar el contenido a 100 ml con agua destilada
Estable 4 semanas a 2-8 °C
- 2 Disolver el contenido con 2 ml de agua destilada
Estable 4 semanas a 2-8 °C
- 3 Emplear el contenido sin diluir
Estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada

METODO.

Longitud de Onda: 365 nm.

Temperatura: 37°C

Medida frente a un valor en blanco (disminución de extinción). Para cada prueba se prepara un valor en blanco

Pipetear en Tubos de ensayo:

	BLANCO	PRUEBA
Solución 1	-	2.50 ml
Solución NaCl 0.9%	2.50 ml	-
Solución 2	-	0.05 ml
Solución 3	-	0.01 ml
Prueba	0.20 ml	0.20 ml

Mezclar y dejar estar 5 min. en el baño María a 37°C.

Verter en las cubetas y medir la extinción frente al valor en blanco. Dejar estar la prueba a 37°C y medir la extinción E_2 frente al valor en blanco exactamente 20 minutos después de la primera lectura. $E_1 - E_2 = E$.

El límite de dilución corresponde a la siguiente diferencia de extinción.

365nm: $E = 0.250$

Con actividades superiores mezclar 0.1 ml de la prueba con 0.9 ml de solución de cloruro de sodio 0.9% y repetir la determinación: resultado por 10.

CÁLCULO

Los valores para la actividad de la aldolasa se calculan según:

$$U/l (37^\circ C) = 101.5 \times E \text{ 365nm.}$$

III.2.6. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA AAN-IFI

FUNDAMENTO.

El suero del paciente (contiene los anticuerpos o globulinas) con las células HEP-2 (antigenos) reaccionan para formar el complejo antígeno-anticuerpo, eliminando las globulinas que no reaccionan después de varios lavados. Dicho complejo Ag-Ac se detecta por fluorescencia al agregar anti-gamma globulina humana marcada con isotiosianato de fluoresceína comercial. El sitio de fijación del anticuerpo al sustrato puede visualizarse por medio de microscopia fluorescente.

MATERIAL Y EQUIPO.

1. Laminillas con una monocapa de células HEP-2 (carcinoma de laringe humano).
2. Gamma globulina anti-humana de conejo conjugada con isotiosianato de fluoresceína.
3. Suero de referencia para los distintos patrones de fluorescencia.
3. Suero de pacientes.
5. Sol. reguladora de fosfato (PBS) pH 7.4.
6. Sol. azul de Evans.
7. Sol. de montaje PBS-Glicerol (v/v).

OTROS ACCESORIOS.

1. Agitador (vortex).
2. Gradilla.
3. Tubos de ensayo 13x100.
4. Pipetas serológicas de 1 y 5 ml.
5. Vasos de Koplín.
6. Cubre objetos de 25x50 mm.
7. Cámara húmeda.
8. Aceite de inmersión.
9. Microscopio de fluorescencia.

MÉTODO

1. Inactivar los sueros a 56°C por 30 min.
2. Hacer diluciones de los sueros problema 1:16 y 1:64.
3. Aplicar una gota de cada dilución de los sueros problema en los pozos. Incluir los sueros de referencia. Incubar en la cámara húmeda por 30 min. a temperatura ambiente.
4. Hacer tres lavados con sol. PBS.
5. Eliminar el exceso de PBS y adicionar 25 ul del conjugado anti-inmunoglobulina humana (mezclar el conjugado con azul de Evans). Incubar por 30 min. a temperatura ambiente (en obscuridad).
6. Hacer tres lavados con PBS.
7. Eliminar el exceso de PBS y poner una gota de sol. de montaje y colocar un cubre objetos (las laminillas deben conservarse en la obscuridad).
8. Leer en el microscopio de fluorescencia y reportar los patrones observados.

III.2.7. MIOGLOBINA.

FUNDAMENTO.

Es una reacción inmunoquímica entre la mioglobina y los anticuerpos contra la mioglobina fijados a partículas de látex. En caso de concentración elevada de mioglobina se produce una aglutinación visible de las partículas de látex (resultado positivo).

MATERIAL Y EQUIPO.

1. Tubos de ensaye de 13 x 100.
2. Gradilla.
3. Pipetas automáticas de 10 y 50 ul.
4. Placas de fondo oscuro.
5. Hisopos de madera.
6. Equipo de Rapi Tex-Mioglobina comercial.

TÉCNICA.

1. Llevar las muestras de suero y los reactivos a la temperatura ambiente.
2. Colocar 50 ul de suero y 10 ul de solución de absorción sobre un campo de la placa de prueba. Mantener los goteros con la apertura perpendicular a la placa de la prueba; las gotas deben caer libremente. Como control para cada muestra se pueden usar 50 ul (una gota) de suero control positivo.
3. Agitar bien el Rapi Tex-Mioglobina en ambas direcciones y colocar aprox. 25 ul (una gota) junto a la gota de suero/sol. de absorción (o suero control). Mezclar bien con un hisopo cubriendo más o menos dos tercios de campo de reacción.

Rotar la placa de prueba lenta y regularmente durante 3 minutos.

INTERPRETACIÓN.

Una aglutinación clara indica normalmente un contenido de mioglobina de 100 ± 20 ug/l y mayor aún.

III.2.8. PROTEÍNA C REACTIVA. PCR

FUNDAMENTO

La prueba se basa en la determinación de la PCR presente en el suero del paciente, que reacciona con las partículas de látex recubiertas con inmunoglobulina anti-proteína C reactiva.

MATERIAL Y EQUIPO.

1. Tubos de ensaye de 13 x 100.
2. Gradilla.
3. Pipetas de 1 ml.
4. Pipetas automáticas de volúmenes variables de 1-200 ul.
5. Placa de vidrio.
6. Hisopos de madera.
7. Sol. amortiguadora de Glicina-Salina pH 8.2.
8. Partículas de látex recubiertas de inmunoglobulina anti-proteína C reactiva.
9. Sueros problema.
10. Suero control negativo y positivo.

TÉCNICA.

1. Colocar en una gradilla 1 tubo 13 x 100.
2. Depositar 0.9 ml de Glicina-Salina pH 8.2.
3. Añadir 0.1 ml del suero problema.
4. Después de haber agregado el suero problema la dilución obtenida es 1:10 y está lista para su uso.
5. En un anillo de la placa depositar 50 ul del suero diluido.
6. En otro anillo depositar una gota de suero control positivo.
7. En un tercer anillo depositar una gota de suero control negativo.
8. Añadir a cada uno de los tres anillos una gota del frasco que contiene látex anti-proteína C reactiva. Previamente resuspendido.
9. Mezclar utilizando un mezclador diferente para cada prueba.
10. Agitar manualmente la placa durante 2 minutos.

INTERPRETACIÓN.

Resultado Positivo.... Presencia de agregados macroscópicos.

III.2.9. FACTOR REUMATOIDE LÁTEX

FUNDAMENTO.

La prueba de factor reumatoide (FR) por látex consiste en la determinación del autoanticuerpo IgG del paciente mediante la técnica de aglutinación de látex (partículas de polietileno recubiertas de gammaglobulina humana). El método es cualitativo.

MATERIAL Y EQUIPO.

1. Tubos de ensayo de 13x100.
2. Pipetas de 1 ml.
3. Pipetas automáticas de volumen variable de 1-200 ul.
4. Placas de fondo oscuro.
5. Hisopos de madera.
6. Equipo de Factor Reumatoide comercial.

TÉCNICA

1. Poner los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Diluir los sueros de los pacientes 1:5 con SSO.9%
3. Depositar una gota (aprox. 40 ul) de la dilución y también una gota de suero control positivo y suero control negativo, listos para su uso en cada una de las áreas de reacción de la placa de fondo oscuro.
4. Añadir una gota (aprox. 40 ul) de reactivo látex-FR (agitar previamente el frasco) a cada muestra de nuestro suero y controles, después de mezclar bien con un palillo agitador, balancear la placa de reacción.
5. Transcurridos 2 min. valorar la aglutinación, para ello comparar con la reacción de los sueros control.

INTERPRETACIÓN

Una aglutinación clara indica la presencia de factor reumatoide (FR): las muestras que no reaccionan con reactivo látex-FR, o no contienen factor reumatoide, o lo tienen a una concentración menor de 20 ul/ml.

III.2.10.FACTOR REUMATOIDE WALLER-ROSE

FUNDAMENTO

El suero del paciente inactivado y eliminado de anticuerpos heterófilos al reaccionar con glóbulos rojos de carnero sensibilizados con hemolisina pueden dar una reacción de aglutinación debido a la presencia del factor reumatoide. El título será la máxima dilución del suero en donde halla aglutinación.

MATERIALES Y EQUIPO.

1. Pipetas automáticas con volúmenes variables (1-200)
2. Tubos de ensayo de 13x100.
3. Baño María.
4. Gradilla.
5. Centrifuga Clínica.
6. Placas de hemaglutinación en U de 96 pozos.
7. Solución Salina isotónica (SS) al 0.85%.
8. Suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5%.
9. Suspensión de glóbulos rojos de carnero sensibilizados al 1% con hemolisina titulada y en una dosis subaglutinante 3 a 4.

TÉCNICA.

ETAPA UND.

1. Inactivar el suero del paciente a 56°C por 30 min.
2. Absorción del suero. Pipetear 200 ul de GRC al 5% en tubo de ensayo y centrifugar a 2000 rpm por 5 min. Después decantar el sobrenadante, resuspender los GRC y agregarles 200 ul de suero inactivado. Incubar por 30 min. a temperatura ambiente.

3. Centrifugar a 2000 rpm por 5 min.

ETAPA 2

1. Pipetear 50 ul de SS en todos los pozos de la placa de hemaglutinación.
2. En la columna número 1 agregar 50 ul de suero absorbido (No.3 etapa 1). Mezclar y hacer diluciones seriadas al doble hasta el pozo número 12.
3. Agregar a todos 50 ul de GRCs al 1%, mezclar por rotación de la placa. Incubar la placa a temperatura ambiente de 2-3 horas. Leer la aglutinación y reportar el título.

POZO	DILUCIÓN	UHA/ml
1	1:2	10
2	1:4	20
3	1:8	40
4	1:16	80
5	1:32	160
6	1:64	320
7	1:128	640
8	1:256	1280
9	1:512	2560
10	1:1024	5120
11	1:2048	10240
12	1:4026	20480

Nota: Incluir SS como testigo negativo, un control normal de suero y un control positivo de título elevado.

INTERPRETACIÓN.

Aglutinación No Aglutinación

III.2.11. COMPLEMENTO C3 Y C4

FUNDAMENTO

El método se basa en la reacción de inmunoprecipitación por inmunodifusión radial. La placa contiene inmunoglobulinas que reconocen a los componentes C3 y/o C4 del complemento. Al colocar el suero de los pacientes que contienen los componentes del complemento, dan como resultado un halo de participación cuyo diámetro es directamente proporcional a la concentración de los componentes del complemento.

MATERIAL Y EQUIPO

1. Pipeta automática de 1 ul.
2. Reqlisis.
3. Placas de inmunodifusión radial que contengan inmunoglobulinas anti-C3 y/o C4.
4. Sueros problemas.
5. Suero control de referencia.

TÉCNICA.

Antes de comenzar la técnica, es importante destapar la caja para que se evapore el agua de condensación.

1. Depositar 5 ul del suero problema y el de referencia.
2. Cerrar la caja e incubar a temperatura ambiente por 48 horas.
3. Medir los diámetros de difusión e interpolar en la curva de calibración.

IV RESULTADOS

Para ambos perfiles se determinaron los valores normales de referencia del grupo control calculándose la $X \pm 2S$ para cada una de las pruebas cuantitativas (Tabla IV.1 y IV.2). Para el grupo PM-DM se calculó media (X) y desviación estándar (S). Tabla IV.3.

TABLA IV.1
VALORES NORMALES DE REFERENCIA
PERFIL ENZIMÁTICO

ENZIMAS (U/L) n=132	$X \pm 2S$	RANGO
CK	118 \pm 90	28 - 208
ALD	2.7 \pm 2.2	0.5 - 4.9
AST	23 \pm 10	13 - 33
ALT	24 \pm 20	4 - 44
LDH	154 \pm 58	96 - 212

TABLA IV.2
VALORES NORMALES DE REFERENCIA
PERFIL INMUNOLÓGICO

PRUEBAS	$X \pm 2S$	RANGO
AAN **	NEGATIVO	HASTA 1:32
MIOGLOBINA *	NEGATIVA	
FR (LATEX) *	NEGATIVO	
FR (WR) **	NEGATIVO	HASTA 80 UHA
PCR *	NEGATIVA	
C3	98 \pm 48	50 - 146mg%
C4	33 \pm 26	7 - 59mg%

TABLA IV.3
PERFIL ENZIMÁTICO GRUPO PM-DM

ENZIMAS	X	S
CK	1368	4029
ALD	12.8	23.3
AST	67	117
ALT	48	38
LDH	322	223

Para determinar si el grupo control fue diferente al grupo en estudio se calculó la media, diferencia de medias y error estandar para cada prueba en cada grupo y se sometieron a una Prueba de Hipótesis por Diferencia de Medias, obteniéndose con el 95% de confianza que dichos grupos son significativamente diferentes en todas las enzimas (Tabla IV.4).

TABLA IV.4
PERFIL ENZIMÁTICO MUSCULAR

ENZIMA	X1	X2	X1-X2	$\sqrt{X1-X2}$	Zcalc.	SIGN.	U1-U2	VNR
CK	1368	118	1250	444.9	2.8	**	378-2122	28-208
ALD	12.8	2.7	10.1	2.6	3.9	**	5.0-15.2	2.7-4.9
AST	67	23	44	13.6	3.2	**	19-69	13-33
ALT	48	24	24	4.3	5.6	**	16-32	4-44
LDH	322	154	168	24.8	6.8	**	119-217	96-212

X1=Grupo Estudio n=82 X2=Grupo Control n=132 ** Muy Significativo

Se calculó la elevación relativa de las enzimas con respecto al límite superior normal y se obtuvo que la CK se elevó en promedio 45 veces, la aldolasa 12 veces, la AST 9 y la LDH y la ALT 4 y 3 veces respectivamente (Fig. IV.1).

Se hizo un seguimiento de cuatro pacientes en etapa aguda y de recuperación y pudimos observar que la que alcanza mayores niveles es la CK en la etapa aguda, y en un promedio de 90 días todos alcanzaron los límites normales a excepción de la LDH (Fig. IV.2).

PERFIL INMUNOLOGICO GRUPO PM-DM.

El análisis del perfil inmunológico se realizó en % de positividad y se obtuvo que los anticuerpos antinucleares fue la prueba con mayor porcentaje de positividad (Fig. IV.3.).

Los resultados de las determinaciones de complemento (C3 y C4) se sometieron al igual que el perfil enzimático por ser una prueba cuantitativa a una prueba de Hipótesis por Diferencia De Medias y se obtuvo con el 95% de confianza que no son significativamente diferentes al grupo control (Tabla IV.5)

TABLA IV.5
 PERFIL INMUNOLOGICO
 PRUEBAS CUANTITATIVAS CUANTITATIVAS

PRUEBAS	X1	X2	X1-X2	X1-X2	Zcalc.
C3	94	98	-4	3.72	-1.04
C4	31	33	2	2.59	0.77

X1 GRUPO ESTUDIO n = 82

X2 GRUPO CONTROL n = 92

En la determinación de anticuerpos antinucleares se observaron diferentes patrones de fluorescencia siendo los más frecuentes el homogéneo y moteado fino (Fig. IV.4).

Se elaboró un diagrama de dispersión para establecer la correlación entre niveles de CK y título de anticuerpos antinucleares y se calculó un coeficiente de regresión de 0.015 (fig. IV.5).

PERFIL ENZIMATICO EN POLIMIOSITIS Y DERMATOMIOSITIS

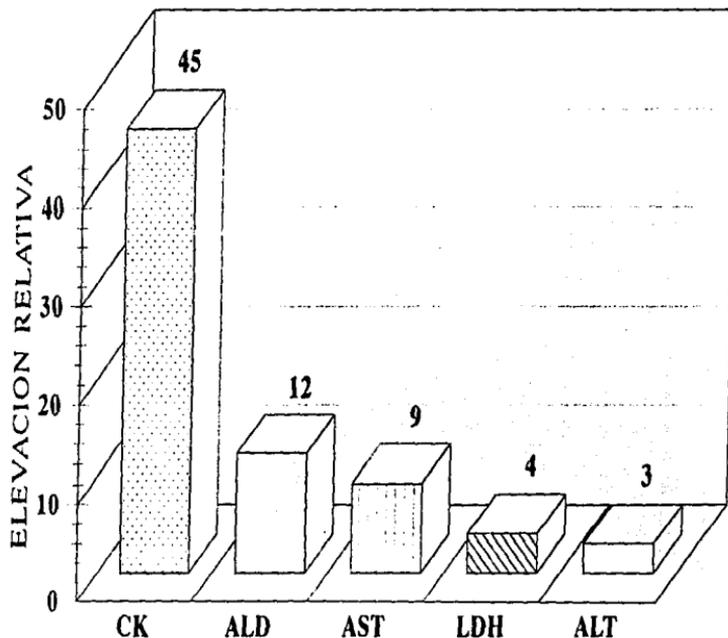


FIGURA IV.1. Elevación relativa del perfil enzimatico con respecto al limite superior normal en pacientes con Polimiositis-Dermatomiositis

NIVELES ENZIMATICOS EN POLIMIOSITIS-DERMATOMIOSITIS

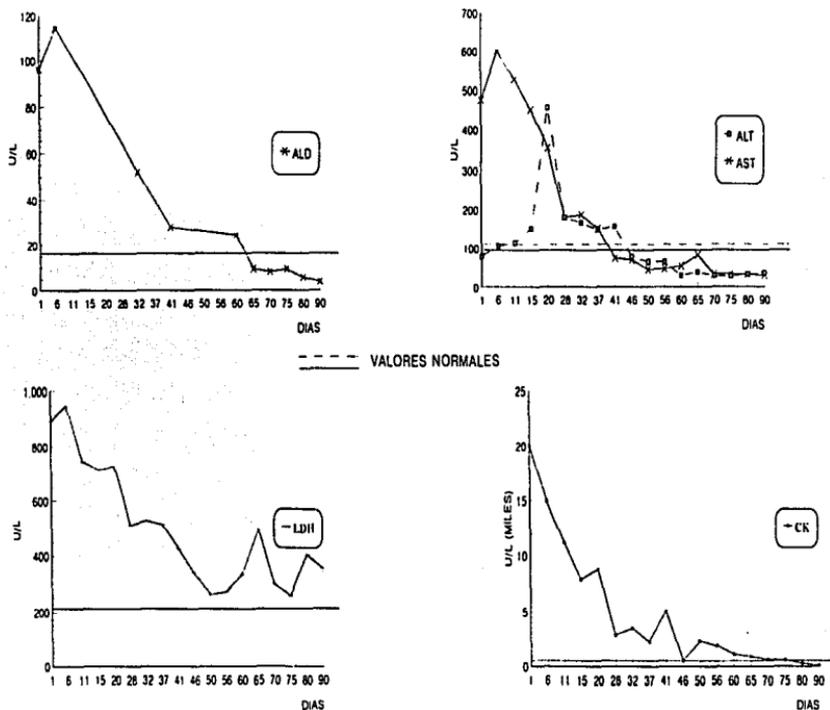


FIGURA IV.2 Promedio de los niveles enzimaticos en cuatro pacientes con Polimiositis-Dermatomiositis en etapa aguda y de recuperación

PERFIL INMUNOLOGICO EN POLIMIOSITIS Y DERMATOMIOSITIS

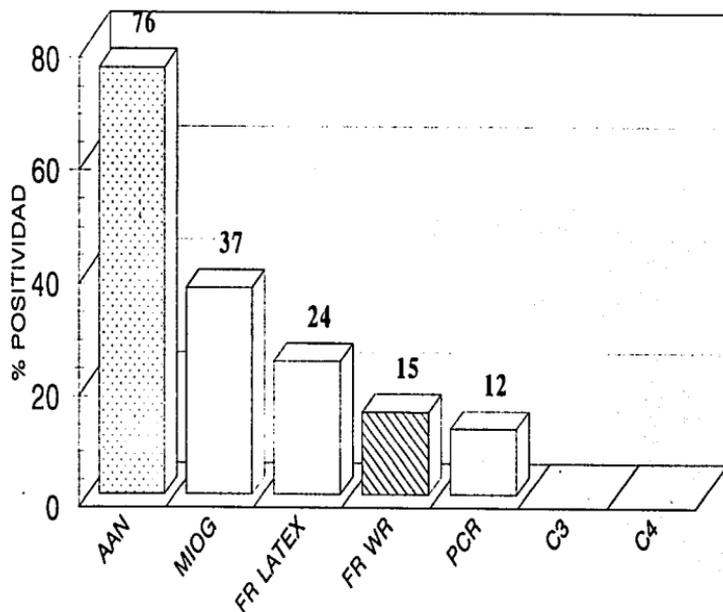


FIG. IV.3. Perfil inmunológico en porcentaje de positividad en pacientes con PM-DM

PORCENTAJES DE PATRONES DE FLUORESCENCIA

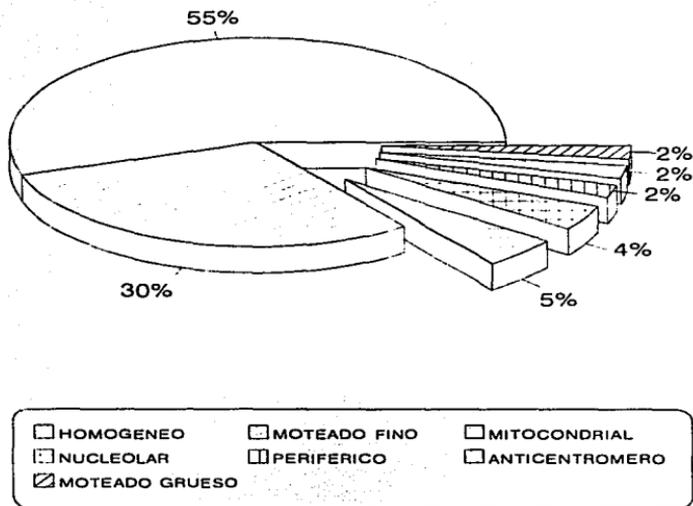


FIGURA IV.4 Porcentajes de Patrones de Fluorescencia en la Determinación de Anticuerpos Antinucleares en Pacientes con Polimiositis-Dermatomiositis

DIAGRAMA DE DISPERSION NIVELES DE CK VS TITULO DE AAN

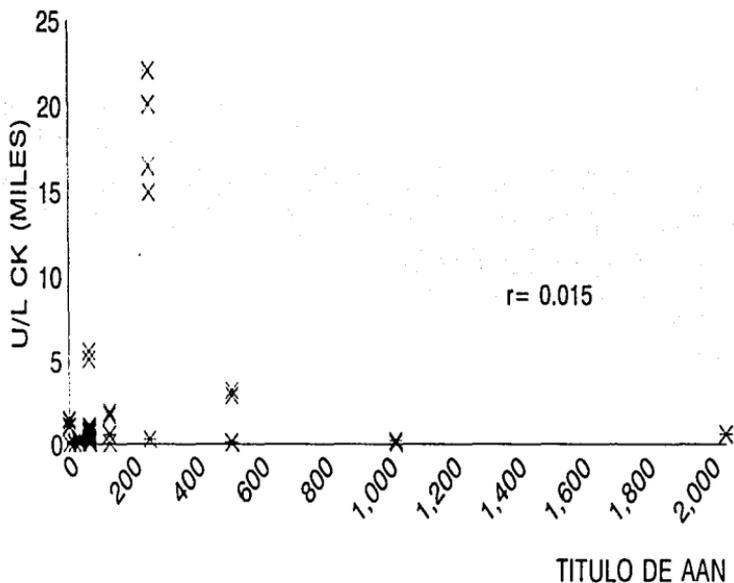


FIG. IV.5. Diagrama de dispersión para establecer la correlación de niveles de CK y títulos de AAN

V. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo analizamos el comportamiento del perfil enzimático en pacientes que cursan con enfermedades de Polimiositis-Dermatomiositis (PM-DM), encontrando que la enzima que más se eleva es la Creatinínasa (CK), siendo estos resultados compatibles con lo reportado en la literatura (6, 38). La CK reportan algunos autores que puede estar marcadamente elevada, raramente arriba de cien veces del límite superior normal (6), nosotros obtuvimos que en nuestro grupo en estudio se elevó en un promedio de 45 veces en relación con el mismo límite (Fig. IV.1).

La determinación de la CK es una de las pruebas enzimáticas más importantes en el diagnóstico de PM-DM, sin embargo, también existen reportes que refieren que arriba del 20% de los casos de PM-DM pueden cursar con valores normales (39, 40), asociándose a esto neoplasias y enfermedad intersticial de pulmón y en consecuencia un mal pronóstico. Sin embargo, esta asociación aún se encuentra en estudio, ya que algunos autores opinan que puede ser meramente un artefacto de un escaso tamaño de muestra por lo que debe ser contemplado con precaución (40).

Las estimaciones generales de CK pueden ser de valor en la evolución de la respuesta de la miositis a la terapia en pacientes en los cuales los niveles iniciales son elevados ya que existe una íntima relación entre valores de CK y remisión de la enfermedad (6, 38).

La CK y la Aldolasa son las dos enzimas con mayor significancia clínica ya que infiriendo estadísticamente en la población de los pacientes que cumplan con el criterio de elevación de enzimas musculares sus niveles serán siempre mayores al rango normal en fase aguda (Tabla IV.4).

La aldolasa esta reportada como la enzima glucolítica más sensible para reflejar enfermedades de músculo, ya que en el caso de distrofia muscular progresiva los pacientes tienen cifras altas antes que aparezca cualquier manifestación clínica de la

enfermedad muscular (27). Sin embargo, pudimos comprobar que no es una prueba muy accesible ignorándose los motivos.

La Aspartato aminotransferasa (AST). La Alanina aminotransferasa (ALT) y la Lactato deshidrogenasa (LDH) son enzimas que aunque estadísticamente son diferentes al grupo control (Tabla IV.4), son menos específicas clínicamente. Las determinaciones de AST y ALT son de mayor valor en el diagnóstico de enfermedades hepáticas o cardíacas. La LDH debido a su inespecificidad por encontrarse en un mayor número de órganos en forma de isoenzimas puede explicar el hecho que tarde más tiempo que todas las enzimas en recuperar sus valores normales (Fig.IV.2). El gran número de circunstancias en que se observan cifras elevadas de LDH mengua la utilidad diagnóstica de su cuantificación (27).

En el perfil inmunológico se observó que en la determinación de los anticuerpos antinucleares (AAN) por inmunofluorescencia indirecta utilizando células HEP-2 como sustrato se obtuvo una prevalencia del 76% y los patrones más frecuentes fueron homogéneo y moteado fino nucleolar y/o citoplasmático (Fig.IV.3 y IV.4). La frecuencia de los anticuerpos antinucleares no difieren de los reportados por los autores (38, 41, 42, 43), ya que han sido reportados entre el 73 y el 89%. El porcentaje y tipo de patrones de fluorescencia si difieren (38, 41), sin embargo la falta de estandarización entre laboratorios para la prueba significa que variables como el uso de sustratos, fijadores y conjugados de isotiocianato y fluoresceína diferentes intervengan en el reporte de resultados y por lo tanto en la unificación de criterios entre laboratorios.

La Miogloblina, El Factor Reumatoide y la Proteína C Reactiva también coinciden con lo reportado en la literatura, pero como también se puede encontrar en el suero de pacientes con miastenia gravis, distrofia muscular y en pacientes con enfermedad de tejido conjuntivo, su relevancia en la patogénesis de estas enfermedades es dudosa y su presencia probablemente es un indicador de necrosis muscular de cualquier etiología en el

caso de la mioglobina (43) o de respuesta inflamatoria en el caso de factor reumatoide y proteína C reactiva (37).

El complemento no reveló ninguna alteración en el presente estudio (Tabla IV.5), existen estudios en los que reportan que en pacientes con dermatomiositis juvenil existe activación de complemento por daño vascular con incremento de C3d desconociéndose hasta la actualidad su mecanismo (44).

El presente estudio puede servir como referencia para una investigación posterior más específica, ya que actualmente la prueba de anticuerpos antinucleares con el uso de células HEp-2 como sustrato sólo se utiliza como prueba tamiz para la identificación inmunoquímica de la gran variedad de antígenos que se han definido y contra los cuales los pacientes con miopatías inflamatorias desarrollan autoanticuerpos. Estos autoanticuerpos se han clasificado en anticuerpos específicos de miositis y anticuerpos inespecíficos. Dentro de éste último grupo, están los anticuerpos antimiosina, los cuales se han encontrado en enfermedades que se acompañan de necrosis muscular crónica, por lo que pueden ocurrir en las miopatías inflamatorias idiopáticas. Los anticuerpos anti-U1-RNPn, anti-Ro, y anti-La, no son específicos de la miositis, pero tienden a observarse en pacientes que cursan con miositis y enfermedad mixta de tejido conjuntivo, lupus o síndrome de Sjogren respectivamente (45).

Por otra parte, un gran número de autoanticuerpos específicos de miositis se ha identificado recientemente. El primero, denominado, anti-Mi se describió en 1976 utilizando una prueba de fijación de complemento (46). Utilizando el suero de un paciente con estos anticuerpos, se encontró que por lo menos había dos anticuerpos precipitantes que se designaron anti-Mi y anti-Mi-2. El antígeno Mi-1 se ha identificado como una proteína con similitud estructural de la inmunoglobulina G de bovina. Los anticuerpos contra este antígeno se ha encontrado en menos del 10% de paciente con Polimiositis-Dermatomiositis y en aproximadamente 5% de pacientes con lupus eritematoso generalizado. El antígeno Mi-2 es sensible a la tripsina y resistente a la enzima RNAsa, pero no ha sido caracterizado

completamente. Utilizando un método inmunoenzimático, se ha encontrado que un 21% de pacientes con Dermatomiositis tienen anticuerpos anti-Mi-2, mientras que en la Polimiositis se ha encontrado en el 2% de los pacientes. En otras enfermedades del tejido conjuntivo no se ha encontrado este anticuerpo (47).

El segundo autoanticuerpo "específico de miositis" que se describió fue el anticuerpo anti-PM-1 que se conoce actualmente como anticuerpo anti-PM-Scl. Estos anticuerpos se encuentran en aproximadamente 10% de los pacientes con miositis, más de la mitad de los cuales tienen un síndrome de sobreposición caracterizado por esclerodermia y miositis. El nivel de este anticuerpo no parece modificarse con la actividad de la enfermedad (48, 49, 50).

El anticuerpo anti-Ke es otro anticuerpo que se ha identificado en pacientes con esclerodermia y miositis. Esta presente en aproximadamente 50% de los pacientes con esta sobreposición y se ha asociado con un mejor pronóstico (51).

Recientemente se ha identificado la presencia de diversos autoanticuerpos específicos de miositis que reaccionan con enzimas sintetizadas del aminoacil del RNA de transferencia (RNAt), a los cuales también inhiben. Los anti-jo-1 son los más representativos de este grupo y se han encontrado en el 30-50% de pacientes con Polimiositis, son menos frecuentes en la Dermatomiositis y no se han detectado en pacientes con la asociación de cáncer y miositis ni en la dermatomiositis juvenil. Actualmente ya se conoce que el antígeno es la histidil del RNA de transferencia (52, 53, 54, 55, 56).

PL-7 es otro sistema antigénico relacionado con las sintetizadas del RNA de transferencia. Los anticuerpos anti-PL-7 se unen e inhiben a la sintetasa de treonil de RNA de transferencia y se ha detectado en el 3-5% de pacientes con miositis (57). El tercer sistema en este grupo es el de los antígenos anti-PL-12, descritos en pacientes con miositis. Sin embargo en este sistema hay dos anticuerpos: uno que inhibe la sintetasa de alanil de RNA de transferencia y otro que se une a la alanil de RNA de transferencia (58, 59).

Con respecto al perfil enzimático, aunque existen tres isoenzimas de CK, la isoenzima CK-MM es la de mayor contribución para la detección de la actividad enzimática por lo cual sería motivo de estudio su cuantificación en estudios posteriores y contribuiría para definir el tipo de trastorno muscular y de esta forma podría descartarse afecciones cardíacas o neuromusculares, entidades en las cuales también se eleva la CK total (60, 61).

Por último se trató de establecer si existía correlación entre la elevación de CK y título de anticuerpos antinucleares calculándose un coeficiente de regresión de 0.015, obteniéndose que no existe correlación entre ambos parámetros (Fig IV.5).

CONCLUSIONES.

1) En el perfil enzimático las enzimas con mayor significancia clínica son la creatincinasa y la aldolasa y en el perfil inmunológico la prueba más específica fueron los anticuerpos antinucleares con patrones homogéneo y moteado fino con la técnica de inmunofluorescencia.

2) El complemento es una prueba que en el presente estudio no revela ninguna alteración.

3) La creatincinasa y la aldolasa pueden manejarse como marcadores de daño muscular agudo, ya que muestran una alta relación entre la actividad de la enfermedad y sus niveles.

4) No existe correlación entre los niveles de creatincinasa y el título de anticuerpos antinucleares.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

APÉNDICE

FÓRMULAS

Media

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Planteamiento de la Prueba de Hipótesis por Diferencia de Medias

1) $H_0 : \mu_1 = \mu_2 \quad (\mu_1 - \mu_2 = 0)$

$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \quad (\mu_1 - \mu_2 \neq 0)$

2) $\alpha = 0.05$

3) Rechacese H_0 si $Z \in (-Z_{\alpha/2}, Z_{\alpha/2})$

De Tablas: $Z_{\alpha/2} = 1.96 \quad (-1.96, 1.96)$

$$Z = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

inferencia para una población.

$$\mu_1 - \mu_2 = \bar{X}_1 - \bar{X}_2 \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$$

$$\text{Error Estándar} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ALANINA AMINOTRANSFERASA. (ALT, antes TGP). Transaminasa hallada en el músculo y en otros tejidos.

ALDOLASA. Enzima del ciclo glucolítico que puede hallarse en el músculo y en otros tejidos.

ANTICUERPO. Glucoproteína producida en el organismo en respuesta directa a la introducción de un antígeno o de un hapteno. Presenta las características de las inmunoglobulinas; es capaz de combinarse específicamente con el antígeno correspondiente.

ANTIÉGENO. Cualquier sustancia que induce en los animales superiores la formación de anticuerpos y/o de reacciones de hipersensibilidad inmunológica activa.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA. (AST, antes TGO). Transaminasa hallada en el músculo y en otros tejidos.

AUTOANTICUERPO. Anticuerpo inducido por los determinantes de algunas células del propio individuo o capaz de reaccionar con ellos, y que provoca a veces manifestaciones patológicas.

CITÓLISIS. Disolución o destrucción celular.

CITOTÓXICO. Que posee la acción de una citotoxina.

CITOTOXINA. Toxina o anticuerpo que aparece en el suero de la sangre después de la inyección de células, y que tiene una acción tóxica específica sobre las células de órganos especiales.

CREATININASA. (CK). Enzima muscular que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfato de creatina al ADP para formar ATP y creatina.

DISTROFIA MUSCULAR. Disfunción de la unidad motora; miopatía hereditaria que afecta las fibras musculares.

ECOGRAFÍA. Obtención de imágenes diagnósticas en dos dimensiones (bidimensional) por resección de ecos rebatados de ondas ultrasonicas.

ELECTROCARDIOGRAMA. Registro gráfico de las corrientes eléctricas producidas por la acción del músculo cardíaco, constituido por una línea quebrada con ascensos y descensos, correspondientes a la actividad auricular y ventricular.

ELECTROMIOGRAFIA. Registro gráfico de las corrientes eléctricas producidas por la contracción muscular o de la reacción de un músculo al estímulo eléctrico.

FIBROSIS. Formación de tejido fibroso.

HEMOGLOBINEMIA. Presencia anormal de hemoglobina en el plasma sanguíneo, por destrucción de los glóbulos rojos.

HEMOGLOBINURIA. Presencia de hemoglobina en la orina, sin hematies, o con muy pocos glóbulos rojos, sintoma de diversas enfermedades infecciosas e intoxicaciones, en las que ha habido destrucción de glóbulos rojos.

IDIOPATIA. Enfermedad de origen primitivo o desconocido.

INMUNOGLOBULINA. Glucoproteína presente en el plasma y otros líquidos orgánicos de la mayoría de los invertebrados, que constituye los anticuerpos.

INSIDIOSA. Que aparece lentamente sin provocar síntomas o signos manifiestos.

ISOENZIMAS. Una de las múltiples formas en las que la enzimas puede existir en el organismo; éste compuesto difiere química y físicamente de la enzima original pero cataliza la misma reacción.

ISQUEMIA. Detención de la circulación arterial en una parte y estado consecutivo de la misma.

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH). Enzima del músculo y otros tejidos que produce lactato a partir de piruvato cuando la cantidad de oxígeno es limitada.

MIOGLOBINA. Proteína muscular que contiene grupo hemo y actúa como una reserva de oxígeno.

MIOGLOBINURIA. Presencia de mioglobina en la orina.

MIOCARDITIS. Inflamación del miocardio.

MIOPATIA. Término general bajo el que se engloban las afecciones de la musculatura esquelética.

MIOSITIS. Inflamación del tejido muscular.

MÚSCULO ESQUELÉTICO. Músculos estriados bajo control voluntario y fijados a los huesos.

NEOPLASIA. Neoformación o nuevo crecimiento de tejido, en el que la multiplicación de las células no está totalmente controlada

por los sistemas reguladores del organismo y tiene un carácter a veces progresivo.

PERICARDITIS. Inflamación del pericardio.

SEPTICEMIA. Estado morboso debido a la existencia en la sangre de bacterias patógenas y productos de las mismas.

TELANGIECTASIAS. Dilatación de los vasos capilares de pequeño calibre generalizada o localizada.

TRIFOSFATO DE ADENOSINA (ATP). Nucleótido que se encuentra en todas las células vivas. Cumple la función de almacenamiento de energía para la actividad celular.

VASCULITIS. Inflamación de un vaso o vasos, principalmente de un vaso sanguíneo o linfático.

BIBLIOGRAFIA

1. Banker BO, Engel AG. Myology basic and clinical. New York. McGraw Hill Book Company 1986; 1385-1422.
2. Burgos R, Vázquez J, Gómez M, Mellado C, Gabor K y Gordillo y Ruelas. La clínica de reumatología pediátrica del Hospital General de México: frecuencia de las diferentes enfermedades. Rev Mex Reumat. 1987;2:39-43.
3. Petersdorf, Adams, Braunwald, Isselbacher, Martin, Wilson. Principios de Medicina Interna, México. McGraw Hill 1986; 3049-3052.
4. Farreras V. Medicina Interna. Barcelona. Doyma 1988: 1046-1048.
5. Uribe M, Esquivel, Badillo H. Medicina Interna. México. Médica Panamericana. 1988: 920-929.
6. Morrow J, Isenberg D, Autoimmune Rheumatic Disease. Oxford. Blackwell Scientific 1987: 234-252.
7. Kaplan AL, Pesce JA. Química Clínica. Métodos de análisis. Teoría, análisis y correlación. Buenos Aires. Médica Panamericana 1988: 596-609.
8. Stites D, Stobo J, Wells V. Inmunología Básica y Clínica. México. El Manual Moderno 1988: 354-383.
9. Wyngaarden J, Smith L. Tratado de Medicina Interna de Cecil. México. Interamericana 1980: 1955-1958.
10. Bohan A, Peter JB. Polyositis and dermatomyositis. N Engl J Med. 1975: 292: 344-347.
11. Bowles NE, Duvowitz V, Sewry CA, Archard LC. Dermatomyositis, polymyositis, and coxsackie B virus infection. The Lancet. 1987;2:1004-1007.
12. Christensen M, Pachman L, Schneiderman R, Patel DC, Friedman J. Prevalence of coxsackie B virus antibodies in patients with juvenile dermatomyositis. Arthritis and Rheumatism. 1986; 29: 1365-1369.

13. Huber SA, Lodge PA. Coxsackie virus B-3 myocarditis. Identification of different pathogenic mechanism in bable nice. Am J Pathol. 1986; 122: 284-291.
14. Mastaglia FL, Djeda VJ. Inflammatory myopathies: Part II Ann Neurol. 1985;17:317-323.
15. Bradley WG, Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. Inflammatory diseases of muscle. Philadelphia. Saunders 1985: 1225-1245.
16. Denman AM. Aetiology. Clin Rheum Dis. 1984; 10: 9-33.
17. Ramirez A, Valecuente F, Castells A. Estudio de las poblaciones linfocitarias circulantes en esclerodermia sistématica, lupus eritematoso discoide crónico y dermatomiositis. Med Cut Ila. 1986; 14: 306-310.
18. Martínez S, Cairo C, Barjau E. Factor tímico sérico en dermatomiositis inactiva. Arch Invest Med. 1984; 15: 255-258.
19. Mastaglia FL, Ojeda VJ. Inflammatory myopathies: Part I. Ann Neurol. 1984; 16: 193-208.
20. Botet-P JC, Grau JM, Urbano - Márquez. Characterization of mononuclear exudate in idiopathic inflammatory myopathies. Virchows Arch A. 1988; 412: 371-374.
21. Urbano - Márquez A. Complejo polimiositis-dermatomiositis. Un tema para debate. Rev Clin Esp. 1989; 184: 199-200.
22. Goldstein R, Duvic M, Targoff IN, Reichlin M, McMenemy A, Reveille J, Warner N, Pollack M y Arnett F. HLA-D Regio genes associated with autoantibody responses to hystidyl transfer RNA synthetase (Jo-1) and other translation-related factors in myositis. Arthritis and Rheumatism. 1990; 33: 1240-1248.
23. Targoff IN, Arnett FC, Clinical manifestations in patients with antibody to PL-12 antigen (alanil tRNAsynthetase). The Am J of Med. 1990; 88: 241-251.
24. Bohan A, Peter JB, Browman RL. A computer assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. Medicine. 1977; 56: 255-286.
25. Benbassat J, Gefel D, Carthoit K. Pronostic factors in polymyositis- dermatomyositis: A computer assisted analysis of ninety two cases. Arthristis Rheumatism. 1985; 28: 249-255.

26. Hochberg MC, Feldman D, Stevens MB. Adult onset polymyositis/dermatomyositis; An analysis of clinical and laboratory features and survival in 76 patients with a review of the interturt. Semin. Arthritis Rheumatism. 1986; 15:168-178.
27. Todd, Sanford, Davidsohn. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. México. Salvat 1991: 313-350.
28. Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD, Spare PD, Inwood MJ. Métodos de Laboratorio. México. Interamericana 1977: 329-355.
29. Anderson S, Cockayne S. Química Clínica. México. Interamericana McGraw-Hill 1955: 241-280.
30. Conn E. Stumpf P. Bioquímica Clínica. México. Limusa 1978: 205-232.
31. De Tsung SH. Clin Chem. 1976; 22: 173-175.
32. Gleichmann E. Mechanisms of autoantibody formation and chemically-induced autoimmunity. Immunology Today. 1989; 8: 30-33.
33. Demanine AG. The molecular biology of autoimmune disease. Immunology Today. 1989; 10(11): 357-361.
34. Tan EM, Chan EK, Sullivan KF, Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin Immunol and Immunopathology. 1988; 47: 121-141.
35. Lehninger A. Bioquímica. Barcelona. Omega S.A. 1978: 112-114.
36. Stauntons E. Bioquímica Médica. Médica. Interamerica 1984: 463-465, 485-489.
37. Reyes P. La proteína "C" reactiva. Rev Mex Reumat. 1989; 4: 104-105.
38. Holden DJ, Keith A, Brownell, Marvin J, Fritzier. Clinical and serologic features of patients with polymyositis or dermatomyositis. Can Med Assoc J. 1985; 132: 649-653.
39. Fudman E Shnitzer T. Dermatomyositis without creatine kinase elevation. The Am J of Med. 1986; 80: 329-332.
40. Nicholls D. Dermatomyositis without creatine kinase elevation. The Am J Med. 1987; 83: 182-183.
41. Sánchez S, Zhongquan W, López R, Avalos E, Reyes P, Cortés J, Hermosillo, Herrera R, Esparza. Prevalencia de anticuerpos

- antinucleares en pacientes con polimiositis y dermatomiositis (PM/DM). Rev Mex Reumat. 1991; 6: 109-113.
42. Fudman EJ, Shunitzer TJ. Clinical and biochemical characteristics of autoantibody systems in polymyositis and dermatomyositis. Semin. Arthritis Rheumatism. 1986; 15: 255-260.
43. García de la Torre I. Autoanticuerpos en polimiositis: relaciones genéticas y ambientales. Rev Mex Reumat. 1991; 6: 167-171.
44. Scott J, Arroyave C. Activation of complement and coagulation in juvenile dermatomyositis. Arthritis Rheumatism. 1987; 30: 572-576.
45. Plotz PH, Dalakas M, Leff RL. Current concepts in the idiopathic inflammatory myopathies. Polymyositis. Dermatomyositis, and related disorders. Ann Int Med. 1989; 111: 143-157.
46. Reichlin M, Arnett FC. Multiplicity of antibodies in myositis sera. Arthritis Rheumatism. 1984; 27: 1150-1156.
47. Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. Arthritis Rheumatism. 1985; 28: 796-803.
48. Reimer G, Sheer U, Peters J, Tan EM. Immunolocalization and partial characterization of a nucleolar autoantigen (PM-Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. J Immunology. 1986; 137: 3802-3808.
49. Reichlin M, Maddison J, Targoff IN. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. J of Clin Imm. 1984; 4: 40-44.
50. Targoff IN, Reichlin M. Nucleolar localization of the PM-Scl antigen. Arthritis Rheumatism. 1985; 28. Arthritis Rheumatism. 1985; 28: 226-230.
51. Mimori T, Hardin JA. Mechanisms of interaction between Ku protein and DNA. J Biol Chem. 1986; 261: 10375-10379.
52. Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. Nature. 1983; 304:177-179.

53. Ramsden D, Chen J, Miller F, Minsener V. Analysis of the myositis-associated anti Jo-1 autoimmune response. The J of inm. 1989; 148: 2267-2272.
54. Nishikai M, Rechlin M. Characterization of the jo-1 antibody system. Arthritis Rheumatism. 1980; 23: 88: 888.
55. Targoff IN, Reichlin M. Measurement of antibody to jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. The J of Inm. 1987; 138: 287jwdh 2882.
56. Oddis CH, Medsger T, Cooperstein L. A subluxing arthropathy associated with the anti jo-1 antibody in polymyositis/dermatomyositis. Arthritis Rheumatism. 1990; 33: 1640-1645.
57. Targoff IN, Arnett F, Reichlin M. Antibody to treonin - transfer RNA synthetase in myositis sera. Arthritis Rheumatism 1988; 31: 515-524.
58. Bunn CC, Berntein RM, Mathews MB. Autoantibody against alanyl-tRNA coexist and are associated with myositis. J Exp Med. 1986; 163: 1281-1291.
59. Targoff IN, Arnett F. Clinical manifestations in patients with antibody to PL-12 antigen (alanyl-tRNA synthetase). The Am J of Med. 1990; 88: 241-251.
60. Passos B, Rabbi B, Azevedo E, Zatz M. Racial effect on serum creatine-kinase: implications for estimation of heterozygosity risks for females at-risk for Duchenne dystrophy. Clin Chem A. 1989; 179:163-168.
61. Arenas J, Díaz V, Liras, Gutiérrez E, Santos I. Activities of creatine kinase and its isoenzymes in serum in various skeletal muscle disorders. Clin Chem. 1988; 34: 2460-2462.
62. Wayne WD. Biostatística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México. Limusa 1983: 155-191.