

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

**Determinación de anticuerpos anti-ADNcd por tres
métodos.
Validación del ELISA Caiotrópico**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ADRIANA ALVARADO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimiento a:

Dr. Fernando Gabilondo Navarro
Director del INCMNSZ

Dr. Jorge Sánchez Guerrero
Jefe del Departamento de Inmunología y Reumatología

Dr. Javier Cabiedes Contreras
Responsable del Laboratorio de de Inmunología y Reumatología

QFB Martha Anabel Gutiérrez Martínez
Jefa del Laboratorio Central

Dr. Antonio Cachafeiro Vilar
Medico Especialista en Reumatología

Dra. Virginia Pascual Ramos
Medico Especialista en Reumatología

Dr. Octavio Velázquez de la Torre
Director Operativo de IANSA S.A. de C.V.

A mi hija, mis padres y mi hermana.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción.....	02
2. Generalidades.....	04
2.1. Antecedentes.....	04
2.2. Anticuerpos anti-cromatina.....	05
2.3. Anticuerpos anti-ADNcd y anti-ADNcs.....	06
2.4. Anticuerpos anti-nucleosomas.....	11
2.5. Anticuerpos anti-histonas.....	12
3. Objetivos principal.....	13
4. Objetivo particulares.....	14
5. Definiciones.....	15
6. Justificación.....	16
7. Hipótesis.....	16
8. Material y Procedimientos.....	17
8.1. Diseño del estudio.....	17
8.2. Población estudiada.....	17
8.3. Muestra.....	17
8.4. Periodo de estudio.....	18
9. Recolección de datos.....	18
9.1. Sistema de variables.....	18
9.1.1. Variables independientes.....	18
9.1.2. Variables dependientes.....	18
10. Instrumentos.....	19
10.1. Parámetros clínicos.....	19
10.1.1. Criterios de Clasificación para LEG del Colegio Americano de Reumatología (ACR).....	19
10.1.2. SLEDAI-2k (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index).....	20
10.1.3. Mex-SLEDAI.....	20

10.1.4. SLICC (Índice de daño para LEG).....	20
10.2. Parámetros de laboratorio.....	20
10.2.1. Detección de anticuerpos anti-ADNcd por el metodo de Farr (RIA).....	21
10.2.2. Detección de anticuerpos anti-ADNcd por ELISA-E.....	22
10.2.3. Detección de anticuerpos anti-ADNcd por ELISA-C.....	24
10.2.4. Deteccion de anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs por ELISA.....	26
10.2.5. Detección de anticuerpos anti-ADNcd mediante Inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato <i>Crithidia lucilae</i>	28
10.2.6. Detección de anticuerpos antinucleares mediante Inmunofluorescencia indirecta.....	32
11. Análisis estadístico.....	36
12. Resultados.....	37
12.1. Características de los sujetos estudiados.....	37
12.1.1. Sujetos Sanos.....	37
12.1.2. Pacientes con LEG.....	37
12.2. Características de las pruebas para detectar anticuerpos anti-cromatina.....	37
12.3. Comparación de las pruebas para detectar anti-ADNcd de isotipo IgG, anti-ADNcs, anti-nucleosomas y anti-histonas.....	38
12.4. Puntos de corte para la detección de anticuerpos anti-cromatina en la población mexicana estudiada.....	46
12.5. Sensibilidad y Especificidad.....	50
12.6. Análisis de la correlación entre anticuerpos anti-cromatina y actividad en pacientes con LEG.....	52
13. Discusión.....	56
14. Conclusión.....	60
15. Bibliografía.....	61
16. Anexos.....	65

1. INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso generalizado es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de títulos altos de autoanticuerpos dirigidos contra distintos antígenos intracelulares, tales como DNA de cadena doble y sencilla (ADNcd y ADNcs), histonas y antígenos extraíbles del núcleo (ENA). No todos estos autoanticuerpos son específicos del LEG, algunos pueden ser producto de la activación policlonal de células B¹.

Otra característica del LEG es la presencia de periodos de remisión y exacerbación de la enfermedad. La presencia de diversos síntomas y signos clínicos puede sugerir actividad del LEG; la medición de la actividad de la enfermedad ha presentado dificultades, a pesar de que Liang et al.² informaron una comparación y validación de los índices usados para medir la actividad de la enfermedad: Systemic Lupus Activity Measure (SLAM), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) y The British Isles Lupus Activity Group (BILAG) que estos sistemas presentan una buena correlación con actividad y entre ellos.

Actualmente se usan los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR)^{3,4} para la clasificación de los pacientes con LEG, según los cuales se deben reunir 4 de los 11 criterios, en un periodo de tiempo determinado para su clasificación.

Los métodos para detectar los autoanticuerpos no están especificados por el ACR y los diferentes ensayos influyen en la interpretación de la prueba¹ Por lo que es necesario homogenizar los estudios de laboratorio para su aplicación.

Títulos altos de anticuerpos anti-ADNcd son altamente específicos para el diagnóstico de LEG, y pueden reflejar la actividad de la enfermedad, así mismo son adecuados para el seguimiento de la actividad y el monitoreo de la respuesta a la terapia. Debido a que estos anticuerpos son heterogéneos en su avidéz, isotipo y reactividades, aquellos de alta avidéz (generalmente isotipo IgG) son los que mayor asociación tiene con el LEG ⁵

Existen diversas técnicas para la detección y cuantificación de los autoanticuerpos anti-cromatina, las cuales varían en el antígeno utilizado y en los isotipos de los anticuerpos anti-ADNcd que se detectan, por lo que su aplicación clínica depende del método de detección empleado. El radioinmunoensayo (técnica de Farr)⁴ que detecta los anticuerpos anti-ADNcd se considerada como el estándar de oro para la detección y monitoreo de los títulos de dichos anticuerpos⁵, sin embargo esta prueba presenta múltiples desventajas.

2. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

La descripción de Hargraves en 1948 de las células LE presentes en la médula ósea de enfermos con LEG proporcionó la evidencia inicial de la existencia de autoanticuerpos que reaccionan contra material nuclear ¹. Casi 10 años pasaron hasta que Friou et al. demostraron con la técnica de inmunofluorescencia indirecta que las inmunoglobulinas presentes en el suero de enfermos con LEG reaccionan contra antígenos nucleares ². Dicha técnica se convirtió en el ensayo clásico para la determinación de los AAN y continúa empleándose en el laboratorio para el diagnóstico de pacientes con enfermedades autoinmunes. Posteriormente Kunkel y Tan utilizaron la técnica de inmunodifusión doble (ID de Outcherlony) y demostraron que además de anticuerpos dirigidos contra ADN y proteínas, los pacientes con enfermedades autoinmunes tienen en circulación otros anticuerpos capaces de precipitar antígenos extraídos con solución salina, como las ribonucleoproteínas (RNP), las cuales contienen al antígeno (Sm) ³. Con el desarrollo de nuevas técnicas como la inmunoprecipitación y la detección de proteínas en fase sólida (Electroinmunotransferencia y el ELISA), las cuales son de alta especificidad y sensibilidad se pudo definir de forma específica la naturaleza del antígeno reconocido y mejorar el potencial diagnóstico en la detección y cuantificación los anticuerpos antinucleares.

Aunque originalmente los AAN fueron descritos como marcadores de enfermedades reumatológicas, éstos han permitido caracterizar una gran variedad de macromoléculas esenciales para el crecimiento y función de las células. Con la llegada de la tecnología del ADN recombinante varias de estas proteínas y ácidos nucleicos han sido clonados y secuenciados, permitiendo la construcción de moléculas que

ayudan a conocer la relación estructura-función y han sido de valor importante como antígenos para dilucidar el papel patogénico de los autoanticuerpos y su participación en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

Estudios con antígenos moleculares clonados han demostrado claramente que la detección de autoanticuerpos tiene una alta especificidad para el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes y además los títulos correlacionan con manifestaciones de la enfermedad ⁴.

2.2. Anticuerpos anti-cromatina

El núcleo de la célula eucariótica es la estructura de mayor tamaño esta compuesta por ADN, ARN y proteínas que desempeñan un papel vital en la síntesis de proteínas y el paso de la información genética de una generación a la siguiente. La doble cadena de ADN se encuentra empaquetada en el núcleo por un plegamiento complejo de alto orden llamado cromatina, estructura que consiste de ADN y numerosas proteínas. La estructura básica de la cromatina tiene conformación como de "rosario" en el que una "cuenta" individual es un nucleosoma. El nucleosoma consiste de 146 pares de bases de ADN enrollados alrededor de pares de cuatro diferentes histonas, H2A, H2B, H3 y H4, y la histona H1 está unida en la parte externa del nucleosoma. Las hebras entre las esferas están formadas por DNA.

La generación de auto anticuerpos contra cromatina es una de las características serológicas del LEG ⁵. Los anticuerpos anti-cromatina han sido detectados en el 88% de los pacientes con LEG y también tienen una alta incidencia en modelos experimentales murinos del lupus, dentro de los cuales el 50 % de las células T cooperadoras son específicas contra nucleosomas ⁶. Los autoanticuerpos dirigidos contra la estructura básica de la cromatina han sido divididos en tres grupos:

anticuerpos que pueden reaccionar contra ADN e histonas y anticuerpos que tiene una mayor afinidad por los nucleosomas completos.

2.2.1 Anticuerpos anti-ADNcd y anti-ADNcs

El ADN es una macromolécula, que consiste en dos cadenas de poli nucleótidos unidas formando una hélice que da vuelta a la derecha. La estructura de esta hélice se define en términos del alineamiento de los grupos fosfato y azúcar o bien por la orientación de las bases. La estructura usual de la cadena doble se conoce como "B", aunque puede existir en otras conformaciones de hélice, las cuales dependen de la secuencia de bases o bien de las concentraciones de sales en el medio; tales estructuras pueden presentarse con menor frecuencia en el ADN o tener una expresión transitoria. Con calentamiento, los puentes de hidrógeno entre las bases se rompen produciendo desnaturalización con separación de las cadenas.

Los anticuerpos anti-ADNcd circulan a títulos altos en los sueros de los pacientes LEG y son poco frecuentes en los de sujetos sanos o con otros padecimientos. Los anticuerpos anti-ADNcd presentes en los pacientes con enfermedades autoinmunes fueron reconocidos por diferentes laboratorios en 1957^{7, 8,}
9,10

En contraste los anticuerpos anti-DNA de cadena sencilla (ADNcs), circulan frecuentemente en los sueros de los pacientes con LEG, y pueden estar presentes en otros padecimientos, lo que hace que disminuya su utilidad como prueba para establecer el diagnóstico de los pacientes con la enfermedad. Las pruebas para detectar anticuerpos anti-ADNcs como antígeno son en general mucho más sensibles; y la preparación del antígeno es sencilla, debido a que la purificación de ADNcd completamente desprovisto de regiones de ADNcs representa toda una dificultad

técnica. La distinción entre anticuerpos contra ADNcs y ADNcd ha sido frecuentemente acentuada en la literatura debido a la importancia de los anti-ADNcd como marcador en el diagnóstico del LEG. Dicho énfasis ha producido desafortunadamente una confusión acerca de la expresión de diferentes especificidades de anticuerpos contra DNA en los pacientes con LEG y su posible papel en la enfermedad. Sin embargo, los sueros de pacientes con LEG tienen actividad contra ambas formas del DNA, de hecho; sueros que reconocen exclusivamente al ADNcd son poco frecuentes, de manera similar, los sueros que solo reaccionan contra ADNcs son raros. Los estudios en pacientes, así como en los reportes de anticuerpos monoclonales anti-DNA, muestran anticuerpos que se unen tanto a ADNcd como a ADNcs, sugiriendo la existencia de epítopes comunes. Además, es probable que los anticuerpos de ambas especificidades sean patogénicos y capaces de inducir daño renal. La utilidad en el diagnóstico del LEG de los anticuerpos anti-ADNcd no debe minimizar el valor de los anticuerpos anti-ADNcs en la patogénesis del LEG ¹¹.

No obstante la correlación entre anticuerpos anti-DNA con la actividad serológica y clínica de la enfermedad pueden distanciarse en algunos pacientes. Una explicación para ésta conclusión es que solo algunos pacientes tiene anticuerpos anti-DNA patogénicos con propiedades inmunoquímicas que promueven el depósito en el riñón y activación del proceso inflamatorio. Múltiples estudios sugieren que el isotipo, la avididad, la especificidad y el punto isoelectrico contribuyen a la patogenicidad. Las pruebas de diagnóstico para detectar anti-DNA no permiten detectar éstas propiedades, y la distinción entre patogénico y no-patogénico es importante para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes con LEG ^{12,13}.

Los anticuerpos anti-ADNcd son muy importantes para el diagnóstico y como marcadores de la actividad de la enfermedad en la mayoría de los pacientes, sin

embargo en el año 1979 se describió un grupo de pacientes con lupus “serológicamente activo y en remisión clínica”¹⁵, los pacientes sin actividad clínica presentaron títulos altos de anti-ADNcd. Los títulos altos de anticuerpos anti-DNA correlacionan con actividad clínica y niveles bajos de la proteína del complemento C3, siendo este último un buen marcador de actividad del LEG.

La patogénesis de la nefritis lúpica ha sido intensamente estudiada por varios años y los anticuerpos anti-ADNcd^{15,16} correlacionan con ésta complicación. Desde 1957 se han descrito una amplia variedad de pruebas usadas para medir anticuerpos anti-DNA. Las pruebas más comúnmente usadas son la técnica de inmunofluorescencia usando *Crithidia lucilae* como sustrato, el ELISA y el RIA^{17, 18, 19}.

La inmunofluorescencia usando como sustrato *Crithidia lucilae* es muy sencilla, razonablemente sensible y tiene alta especificidad debido a que el DNA que se encuentra en el cinetoplasto es puro (ADNcd circular) y los anticuerpos dirigidos contra ADNcd, difícilmente son detectados en otras enfermedades diferentes al LEG. En el ELISA, el ADN que recubre a la placa de plástico queda unido a ésta por compuestos intermediarios tales como la poli-L-lisina, protamina o albúmina sérica bovina metilada. La rapidez y facilidad de tener placas recubiertas puede producir problemas relacionados con la unión de complejos inmunes y/o inmunoglobulinas no exclusivamente dirigidos contra ADN en las placas²⁰. Una alternativa es el uso de ADN biotinilado y cubierto con estreptavidina²¹. Esta modificación hace al ELISA para detectar anti-DNA menos susceptible a interacciones no específicas.

La prueba de Farr fue introducida en 1968²², emplea la precipitación con sulfato de amonio para separar los complejos anticuerpos anti-ADN (marcado con radioisotopo) del ADN marcado libre. Este radioinmunoensayo (RIA) ha mostrado ser muy específico para los pacientes con LEG, si se usa ADNcd puro como antígeno^{23,24}.

El ADNcd circular marcado con timidina ^3H , por ejemplo, puede provenir de *Pseudomonas* o de *Escherichia coli*. El ADN de timo de ternera marcado, ha demostrado ser mas susceptible a la unión no especifica ²⁵.

Generalmente, las pruebas de comparación entre ensayos en los que se prueban sueros de pacientes con LEG definido, muestran una importante correlación. Sin embargo con base en el tamizaje de los sueros de rutina (especialmente aquellos de diagnóstico dudoso de LEG), existe gran discrepancia entre los diferentes ensayos. La susceptibilidad de los ensayos puede explicarse solo en parte observando las discrepancias. Es probable, que las diferencias entre los resultados obtenidos por los diversos métodos dependen del sistema utilizado. Las diferencias incluyen:

- Fuente del antígeno: el ADN puede ser de origen eucariótico o procariótico, de doble cadena o de cadena sencilla, de diferente tamaño y homogeneidad, etc.
- Diferente presentación del antígeno al anticuerpo: el RIA generalmente se realiza en solución, en tanto el ELISA el antígeno esta pegado a la placa de plástico y en la prueba de *Crithidia lucilae* el ADN esta en su mayor parte en su conformación nativa dentro del núcleo de las células.
- Condiciones de reacción: las condiciones son diferentes, por ejemplo la precipitación con sulfato de amonio, que es un paso en la prueba de Farr (RIA), hace que los anti-ADNcd de baja avidéz no puedan ser detectados. En aquellas pruebas en las que se emplea un segundo anticuerpo, como la IFI y el ELISA

en los que el isotipo del anticuerpo conjugado es importante, con frecuencia solo se mide el isotipo IgG debido a su mayor correlación con la actividad de la enfermedad.

- Afinidad del anticuerpo: los anticuerpos anti-ADNcd de alta afinidad son mas relevantes en la patogénesis de LEG, particularmente en la nefritis. Los anticuerpos de baja afinidad no se detectan en la prueba de Farr, pero son detectados en el ELISA.
- El isotipo de los anticuerpos detectados: todos los isotipos pueden ser detectados mediante ELISA e IFI con *Crithidia lucilae* por el uso de anti-sueros poli-valentes, sin embargo, el isotipo IgG es de mas relevancia ^{26, 27} debido a que los anti-ADNcd IgM no son específicos de LEG ^{25, 28}.
- Parámetros específicos: en las pruebas pueden ser causa de falsos positivos, por ejemplo la contaminación con proteína C reactiva o ADNcs en la prueba de Farr. La contaminación con ADNcs en el ELISA produce una sobre estimación de los niveles de anti-ADNcd, debido a que hay anticuerpos que se unen tanto a ADNcd como a ADNcs.
- Problemas con la estandarización y calibración: una prueba debe ser precisa, (es decir debe dar el mismo resultado, al repetir la prueba), y exacta, produciendo el mismo resultado en

otras pruebas y todas las muestras deben ser comparables en aquellos lugares donde se realiza la prueba. La Organización Mundial de la Salud, dispone de sueros estándar (Wo80) para mejorar la estandarización entre los diferentes ensayos.

Un ejemplo de la complejidad en la detección de los anticuerpos anti-ADNcd es que recientemente se ha obtenido evidencia que indica que las histonas o los nucleosomas forman complejos con anticuerpos anti-nucleosomas, dando reacción positiva en el ensayo de Farr ²⁹. Es aconsejable que las pruebas para detectar anti-DNA sean cuantitativas y estas se expresen en unidades internacionales, para permitir la comparación entre diferentes equipos.

2.2.2 Anticuerpos anti-Nucleosoma

Los nucleosomas son los elementos básicos que conforman la cromatina. Durante la muerte celular, particularmente durante la apoptosis la actividad de las endonucleasas corta a la cromatina en fragmentos que incluyen nucleosomas completos. Los nucleosomas liberados en la circulación son rápida y efectivamente removidos por el metabolismo hepático o por el sistema inmunológico en condiciones normales ³⁰. La autoinmunidad contra nucleosomas y particularmente contra componentes individuales de los nucleosomas (ADNcd, ADNcs e histonas), es importante en la patogénesis del LEG, además permite su detección establecer el diagnóstico de LEG. Los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas pueden aumentar en diversos padecimientos, cualquiera en el contexto de la verdadera autoinmunidad o en inmunidad dependiente de la expresión, por ejemplo proteína viral unida a nucleosomas.

En relación a los anticuerpos anti-nucleosoma no está totalmente claro como puede ser definida su especificidad. Los anticuerpos pueden ser específicos contra componentes de los nucleosomas tales como las histonas y otras proteínas no histonas, o ciertas conformaciones de proteínas con nucleosomas unidos a ADN. Recientemente se ha propuesto que los anticuerpos anti-nucleosomas puedan ser un marcador mas sensible que los anticuerpos anti-ADNcd para el LEG, y casi exclusivos para LEG, escleroderma y enfermedad mixta del tejido conectivo ³¹. En el proceso del diagnóstico del LEG, se ha recomendado que la detección de los anticuerpos antinucleares específicos deba extenderse a los nucleosoma, entre otros auto-antígenos ³².

2.2.3 Anticuerpos anti-Histonas

Las histonas son proteínas que se unen al DNA, son ricas en aminoácidos básicos, representan un importante componente de las proteínas del núcleo de células eucarióticas. Existen 5 tipos de histonas en el núcleo y cada una está clasificada en dos grupos principales.

- Histonas H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas H3 y H4 son ricas en arginina y forman un tetrámero que contiene dos moléculas de cada una de ellas. Las histonas H2B y H2A son ricas en lisina, forman dímeros y complejos oligoméricos superiores
- Las histonas H1 son ricas en lisina y se encuentran fuertemente unidas a la cromatina, por tanto, son fácilmente removidas con solución salina, después de lo cual la cromatina se vuelve soluble en soluciones acuosas.

En condiciones fisiológicas, dos de estos tetrámeros de histonas se unen para formar un octamero de histonas.

Es frecuente encontrar anticuerpos anti-histonas en pacientes con títulos altos de anti-ADN en enfermedades reumáticas. Sin embargo a pesar de su frecuencia y potencial importancia en los síndromes clínicos la detección de anticuerpos anti-histonas ha recibido poca atención con respecto a otros anticuerpos antinucleares. Además, existen numerosas discrepancias en las publicaciones para encontrar la especificidad de los anticuerpos anti-histonas. Algunas de las razones técnicas son los reactivos comerciales, los cuales son extractos de histonas semi-purificadas que contienen los diferentes tipos de histonas y están con frecuencia contaminadas con proteínas no histonas del ADN. La purificación de histonas es un proceso lento y requiere de una adecuada verificación de la calidad de la preparación.

Las histonas son extremadamente sensibles a la digestión por proteasas y requieren de cuidados especiales para prevenir la degradación. Las pruebas confiables y sensibles para detectar los anticuerpos anti-histonas son las que se realizan en fase-sólida tal es el caso de la electroinmunotransferencia, el ELISA y el RIA.

Los anticuerpos anti-histonas son un grupo de anticuerpos antinucleares presentes en pacientes con LEG con una frecuencia estimada del 50 al 70% en pacientes sin seleccionar y más del 80% en pacientes con enfermedad activa. La reactividad contra las histonas H1 y H2B han sido las más comúnmente observadas^{33, 34, 35, 36, 37}. La discrepancia entre los reportes es con certeza resultado de las dificultades metodológicas mencionadas anteriormente y de la carga genética, sin embargo; hay estudios que indican que la reactividad es extremadamente heterogénea

entre diferentes pacientes y con LEG, debido a que estos pacientes presentan autoanticuerpos contra histonas individuales y/o contra complejos de histonas.

Los anticuerpos anti-histonas también se han detectados en pacientes con LEG inducido por fármacos, tales como procainamida, en la que los anticuerpos están dirigidos contra las histonas H2A y H2B ^{38,39,40}.en tanto que la hidralazina induce la síntesis de anticuerpos dirigidos contra las histonas H3 y H4 ⁴⁰.

3. OBJETIVO PRINCIPAL:

Estudiar si existe correlación entre la prueba de ELISA-C para detectar anticuerpos anti-ADNcd con el método de Farr (RIA), la prueba de ELISA-E y la inmunofluorescencia usando como sustrato *Crithidia lucilae*, en pacientes con LEG.

4. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estandarizar el ELISA-Caiotrópico de alta avidéz para la detección de los anticuerpos anti-ADNcd en sueros de sujetos sanos mexicanos.
- Establecer los puntos de corte de los anticuerpos anti-ADNcd detectados mediante RIA, ELISA e IFI, en una población sana de México.
- Establecer los puntos de corte de los anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs, en una población sana.
- Comparar la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y RV de los tres métodos para el diagnóstico de LEG (ELISA-E, ELISA-C y prueba de Farr).
- Determinar la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y RV de los anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs.

- Determinar la frecuencia de anticuerpos anti-ADNcd, anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs en pacientes activos e inactivos con LEG.
- Correlacionar la presencia de anticuerpos anti-ADNcs, anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs con la actividad de la enfermedad en pacientes con LEG.

5. DEFINICIONES

- Pacientes: Individuos que cumplen los criterios de clasificación del ACR para LEG ^{3,4}.
- Donador sano: Individuos sanos del INCMNSZ con serología negativa para VDRL, HIV I y II, VHB, VHC, HTLV1 y 2.
- Anticuerpos antinucleares: Inmunoglobulinas caracterizadas por su especificidad contra antígenos del núcleo y citoplasma.
- ELISA-C: Ensayo Inmunoenzimático caiotrópico, Farrzyme™ que utiliza solución de lavado con alta concentración de sales.
- ELISA-E: Ensayo Inmunoenzimático estándar, Bindazyme™ que utiliza solución de lavado convencional (isotónica e isoosmótica).
- Pacientes activos con LEG: Individuos con LEG que al sumar las variables del SLEDAI-2k, es igual o mayor a tres. Se tomó en consideración la presencia del hallazgo (variable), si éste está

presente en el momento de la evaluación o su ocurrencia en los últimos 10 días.

- Pacientes inactivos: Individuos con LEG que al sumar las variables del SLEDAI-2k, es igual o menor a dos. Se tomó en consideración la presencia del hallazgo (variable), si éste está presente en el momento de la evaluación o su ocurrencia en los últimos 10 días.

6. JUSTIFICACION

Existen diversas técnicas para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-ADNcd, las cuales varían respecto al antígeno utilizado y al tipo de anticuerpos anti-ADNcd que se detectan, por lo que su aplicación clínica depende del método de detección empleado. La prueba de Farr (RIA) se considerada como el estándar de oro para la detección y monitoreo de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd, ésta prueba tiene la desventaja de usar radioisótopos (^{125}I , ^{14}C o ^3H), el resultado del estudio tarda 8 horas mínimo y no permite identificar el isotipo de las inmunoglobulinas detectadas. En contraste, el ELISA es una prueba alternativa que produce resultados similares a la prueba de Farr para la detección de los anticuerpos anti-ADNcd, además, el tiempo de obtención de los resultados es 3.5 horas máximo para el ELISA y permite detectar el isotipo. La desventaja es que el ELISA tiene muy baja especificidad. La Inmunofluorescencia es también una prueba alternativa, sin embargo menos sensible, aunque con una especificidad razonable, y su determinación requiere de personal con amplia experiencia.

7. HIPÓTESIS

El ensayo de Farr para la detección de anticuerpos anti-ADNcd de alta avidéz se considera el estándar de oro por su sensibilidad, especificidad y por su correlación con la actividad en pacientes con LEG. Consideramos que el ELISA caiotrópico mostrará mejor correlación con actividad de la enfermedad en pacientes con LEG.

Lo cual nos permitirá utilizar el ELISA caiotrópico para la cuantificación de anticuerpos anti-ADNcd, que servirán para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con enfermedades autoinmunes.

8. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO

8.1. Diseño:

8.1.1. Estudio Transversal.

8.2. Población a estudiar:

8.2.1. Sujetos Sanos: individuos obtenidos del banco de sangre de donadores del INCMNSZ.

8.2.2. Pacientes con LEG: Individuos que reúnen 4 o mas criterios del ACR ^{3,4} que se atienden en la consulta externa del departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ.

8.3. Muestras:

8.3.1. Sujetos Sanos: Se estudiaron 102 sueros, 67 femeninos y 35 masculinos, en cuyos sueros fueron negativos en los siguientes exámenes de laboratorio: HTLV 1 y 2, hepatitis B, C, HIV I, HIV II y VDRL.

8.3.2. Pacientes: Se estudiaron 98 pacientes con LEG, evaluados por Reumatólogos^{1, 2} quienes determinaron el número de criterios, fecha de aparición los criterios para LEG, de acuerdo al ACR, grado de actividad de la enfermedad de acuerdo a: Systemic Lupus Erithematosus Disease

¹ Dr. Antonio Cachafeiro Vilar.

² Dra. Virginia Pascual Ramos.

Activity Index (SLEDAI-2K^{1, 2)} y Mex-SLEDAI^{1,2} y al índice de daño para LEG (SLICC/ACR)¹. En la misma visita se tomó una muestra de 8 mL de sangre periférica para la detección de anticuerpos.

8.4. Periodo de Estudio:

8.4.1. mayo - agosto del 2005

9. RECOLECCIÓN DE DATOS

9.1. Sistema de variables:

9.1.1. Variables Independientes:

9.1.1.1. Edad

9.1.1.2. Genero

9.1.1.3. SLEDAI-2k^{42, 43}.

9.1.1.4. MEX-SLEDAI^{44, 45}.

9.1.2. Variables dependientes:

9.1.2.1. Niveles séricos de anticuerpos anti-ADNcd

9.1.2.2. Niveles séricos de anticuerpos anti-nucleosomas

9.1.2.3. Niveles séricos de anticuerpos anti-ADNcs

9.1.2.4. Niveles séricos de anticuerpos anti-histonas

10. INSTRUMENTOS

10.1. Parámetros clínicos:

10.1.1. Criterios de Clasificación para LEG del Colegio Americano de Reumatología (ACR)^{3,4}:

10.1.1..1. Eritema malar.

10.1.1..2. Eritema discoide.

10.1.1..3. Fotosensibilidad.

10.1.1..4. Úlceras orofaríngeas.

10.1.1..5. Artritis.

10.1.1..6. Serositis:

10.1.1..6.1. Derrame pleural.

10.1.1..6.2. Derrame pericárdico.

10.1.1..7. Daño renal:

10.1.1..7.1. Proteinuria mayor a 0.5 g/24 h.

10.1.1..7.2. Presencia de cilindros celulares.

10.1.1..8. Daño neurológico:

10.1.1..8.1. Convulsiones.

10.1.1..8.2. Psicosis.

10.1.1..9. Daño hematológico:

10.1.1..9.1. Anemia hemolítica

10.1.1..9.2. Leucopenia (menos de 4000/uL)

10.1.1..9.3. Linfopenia (menos de 1500/uL)

10.1.1..9.4. Trombocitopenia

10.1.1..10. Alteraciones inmunológicas:

Títulos altos:

- Ac. Anti-ADNcd
- Ac. Anti-Sm
- Ac. Anti-cardiolipina

10.1.1..11. Anticuerpos antinucleares positivos

10.1.2. SLEDAI-2k^{42,43} (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) (Anexo 1)

Se tomo en consideración la presencia del hallazgo (variable), si éste estaba presente en el momento de la evaluación o su ocurrencia en los últimos 10 días. Si la suma de las variables fue igual o mayor a tres, el paciente estaba activo.

10.1.3. Mex-SLEDAI^{44,45} (Anexo 1)

La calificación del índice clínico MEX-SLEDAI es la suma total de los puntos de cada variable. Se tomo en consideración la presencia del hallazgo (variable), si este estaba presente en el momento de la evaluación o su ocurrencia en los últimos 10 días. Si la suma de las variables era igual o mayor a tres, se considero que el paciente estaba activo.

10.1.4. SLICC⁴⁶ (Anexo 1): Índice de daño para LEG:

Daño: Cambio no reversible, no asociado a inflamación activa, ocurrido desde el inicio del LEG, confirmado por exámenes clínicos y presente por al menos 6 meses, a menos que se señale lo contrario en episodios repetidos separados durante los últimos seis meses la calificación es de 2, la misma lesión no fue cuantificada dos veces.

10.2. Parámetros de laboratorio:

Las muestras de sangre de los pacientes se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se separó el suero, mismo que permaneció almacenado a – 20 °C hasta su posterior uso en la cuantificación de anticuerpos. Las pruebas de ELISA se realizaron de manera automatizada con el equipo DSX (Dynex Technologies), el cálculo del título de los anticuerpos se realizó de manera automática por el equipo. Antes de realizar los ensayos se verificó que el equipo tuviera un funcionamiento adecuado de todos sus módulos.

10.2.1. Detección de anticuerpos anti-ADNcd por el método de Farr (RIA):

10.2.1.1. Principio de la prueba:

La prueba de Farr emplea la precipitación con sulfato de amonio para separar los complejos ADN/anticuerpos anti-ADN (marcado con isótopo) del ADN libre. El RIA ha mostrado ser muy específico para los pacientes con LEG, si se usa ADNcd puro como antígeno. El ADNcd circular radio marcado con radio isótopo (Timidna tritiada ^3H , por ejemplo), puede provenir de *Pseudomonas* o de *Escherichia coli*. El ADN de timo de ternera marcado, ha demostrado ser más susceptibles a la unión no específica. Los cultivos de bacteriófagos provenientes de *Pseudomonas* o *Escherichia coli*, son adicionados con ^3H -timidina o ^{125}I -yodocitidina y los cuales se incorporan al ADN durante la división celular.

En esta prueba el ADN unido y libre es separado por precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio. El ADN radioactivo unido a las inmunoglobulinas es precipitado y el ADN radioactivo libre permanece en el sobrenadante. Otra variante del RIA en fase sólida en la que el ADN no radioactivo se

une a las microplacas y posteriormente se adicionan los sueros de los pacientes con LEG; para hacer evidente la reacción se agrega un anticuerpo anti-IgG/IgM unido a radioisótopo. La reacción se mide en cuentas por minuto (CPM).

10.2.1.2. Manejo y almacenamiento:

La determinación de los anti-ADN por Farr se realizó en los laboratorios Speciality de EUA. Antes de enviar las muestras se conservaron entre 2-8 °C, al resguardo de la luz.

10.2.1.3 Procedimiento:

El ensayo fue realizado en Speciality Laboratorios (270027 Tournay Road, Valencia CA 91355-5386, EUA). El laboratorio reporta el valor obtenido, en IU/mL y sus rangos de referencia son:

Menos de 5.0 IU/mL	No detectado
5.0-10.0 IU/mL	Indeterminado
Mas de 10.0 IU/mL	Detectado

10.2.3 Detección de anticuerpos anti-ADNcd por ELISA-E:

10.2.3.1 Principio de la prueba:

El antígeno ADNcd de timo de ternera esta inmovilizado en la fase sólida (microplaca de ELISA). Los calibradores controles y muestras de pacientes

diluidas se adicionan a los pozos y los anticuerpos específicos reconocen al antígeno (ADNcd) uniéndose durante el primer tiempo de incubación. El resto de los componentes no reactivos del suero, se eliminan mediante lavados. La unión de los anticuerpos anti-ADNcd se pone de manifiesto mediante un anticuerpo de conejo anti-IgG humana (especifico contra cadena γ) conjugado a la enzima peroxidasa (HRP), si existen anticuerpos unidos a las placas se formara el complejo antígeno/anticuerpo/conjugado. El exceso de anticuerpo que no se une es eliminado mediante lavados. La unión del conjugado se visualiza con el sustrato TMB el cual es hidrolizado por la enzima produciendo un color azul. Para detener la reacción se adiciona una solución ácida con lo que se forma un producto de color amarillo en los pozos de las microplacas. La intensidad del color se mide en un espectrofotómetro a 450 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo IgG presente en la muestra.

10.2.3.2 Manejo y almacenamiento:

Una vez iniciados los ensayos las muestras se conservaron entre 2-8 °C, al resguardo de la luz y antes de iniciar el ensayo, las muestras y los reactivos se dejaron a temperatura ambiente durante 60 minutos.

10.2.3.5 Procedimiento:

Fabricante: The Binding Site. Se diluyeron 10 μ L de la muestra en 100 μ L de diluyente y se homogeneizó la mezcla. Se adicionaron 100 μ L de los calibradores, controles y muestras diluidas en los pozos correspondientes en la placa de micro ELISA. Se incubó durante 30 minutos a TA. Se realizaron tres lavados con 300 μ L/pozo de solución de lavado para el ELISA-E. Posteriormente se adicionaron

100 μ L/pozo del conjugado anti-IgG-HRP y se incubó durante 30 minutos a TA. Se hizo otro ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron 100 μ L/pozo del sustrato TMB. Se incubó durante 30 minutos a TA. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 μ L/pozo de la solución de paro (ácido fosfórico 3.0 M). Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm. El cálculo de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd en las muestras se realizó de manera automática en el equipo DSX. El rango de medición de la prueba es de 12.3-1000.0 IU/mL.

10.2.3.5 Control de Calidad:

Los resultados de la prueba se expresan en IU/mL tomando como referencia el suero Wo80 de la WHO. Los límites obtenidos de todos los controles deben estar dentro del rango establecido en el certificado de calidad. La forma de la curva debe ser similar a la curva de calibración mostrada en el certificado de calidad.

Control ADNcd	Rango (UI/mL)
Positivo	220-380
Negativo	<30
ADNcs	<50

10.2.3.5 Método de cálculo:

La curva de calibración se grafica automáticamente por el equipo DSX (programa Revelation 5.15), en el cual la concentración de anticuerpos anti-ADNcd de cada calibrador en escala logarítmica se localiza en el eje de las ordenadas y las DO a 450 nm en escala lineal se localizan en el eje de las abscisas. El título de anticuerpos anti-DNA de controles y muestras diluidas se obtuvo interpolando las DO en la curva.

El rango de medición de la prueba es de 12.3-1000 IUI/mL. El límite de sensibilidad es de 4.6 IU/mL.

10.2.4. Detección de anticuerpos anti-ADNcd por ELISA-C

10.2.4.1 Principio de la prueba:

Para esta prueba el principio es el mismo que para el ELISA-E, con la diferencia de que el tipo de solución de lavado es diferente, esta solución tiene una concentración de sales elevada, permitiendo así que aquellos anticuerpos de baja avidéz sean eliminados en el primer paso de lavado.

10.2.4.2 Manejo y almacenamiento:

Una vez iniciados los ensayos las muestras se conservaron entre 2-8 °C, al resguardo de la luz y antes de iniciar el ensayo, las muestras y los reactivos se dejaron a temperatura ambiente durante 60 minutos.

10.2.4.3 El procedimiento:

Fabricante: The Binding Site. Es el mismo que para el ELISA-E, excepto en el procedimiento de lavado, y de acuerdo a las instrucciones del fabricante (TBS). Para el lavado automático, el equipo no se programo para incluir pasos de remojo y no se permitió que el lavado en los pozos se prolongara más del tiempo que toma llenar la placa. El rango de medición de la prueba es de 12.3-1000 IU/mL. El límite de sensibilidad es de 12.3 IU/mL.

10.2.5.1. Control de Calidad:

El mismo que para el ELISA-E, solo cambia el valor del control para ADNcs.

Control ADNcd	Rango (UI/mL)
Positivo	220-380
Negativo	<30
ADNcs	<30

10.2.4.5 Método de cálculo:

Es el mismo que para el ELISA-E

10.2.5. Detección de anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs por ELISA:

10.2.5.1. Principio de la prueba:

El antígeno (nucleosomas humanos, histonas altamente purificadas [H1, H2A, H2B, H3, H4 y ADNcs recombinante] se encuentran inmovilizados en la fase sólida (microplaca de ELISA). Si están presentes anticuerpos específicos en las muestras diluidas se unirán a los antígenos inmovilizados. Después de una incubación la microplaca es lavada con la solución específica para remover componentes del suero no reactivos. La unión de los anticuerpos (anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs) se pone de manifiesto mediante un anticuerpo de anti-IgG humana, conjugado

con la enzima peroxidasa (HRP), el cual formara un complejo antígeno/anticuerpo/conjugado si hay anticuerpos específicos presentes. El exceso de anticuerpo que no se une es eliminado mediante lavados. La unión del conjugado se visualiza con el sustrato TMB el cual es hidrolizado por la enzima produciendo un color azul. Para detener la reacción se adiciona una solución ácida, formando un producto de color amarillo. La intensidad de este color se mide con un espectrofotómetro a 450 nm. Se recomienda realizar la lectura con una longitud de referencia entre 600 y 690 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo IgG presente en la muestra.

10.2.5.2. Manejo y almacenamiento:

Una vez iniciados los ensayos las muestras se conservaron entre 2-8 °C, al resguardo de la luz y antes de iniciar el ensayo, las muestras y los reactivos se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

10.2.5.3 Procedimiento:

Fabricante: ORGENTEC Diagnostika. Se diluyeron 10 µL de la muestra en 100 µL de diluyente y se mezclaron. Se adicionaron 100 µL de los calibradores, controles y muestras diluidas en los pozos correspondientes en las placas. Se incubó durante 30 minutos a TA. Se realizaron tres lavados con 300 µL/pozo de solución de lavado. Posteriormente se adicionaron 100 µL/pozo del conjugado anti-IgG-HRP y se incubó durante 15 minutos a TA. Se hizo otro ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron 100 µL/pozo del sustrato TMB. Se incubó durante 15 minutos a TA. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 µL/pozo de la solución de paro. Finalmente, se lee la absorbancia a 450 nm, con filtro de referencia de 620 nm. El

cálculo de los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs de las muestras se realizó de manera automática por el equipo DSX. El límite de sensibilidad para las tres pruebas es de 1.0 U/mL.

10.2.5.4 Control de Calidad:

Las pruebas se validan si la densidad óptica a 450 nm de los controles, y de los calibradores A y F cumplen con los rangos indicados en el certificado de control de calidad.

Prueba	Estándar A OD	Estándar F OD	Control +1 U/mL	Control -2 U/mL
Anti-nucleosomas	< 0.150	> 1.300	40-70	< 20
Anti-histonas	< 0.150	> 1.300	65-95	< 15
Anti-ADNcs	< 0.150	> 1.300	60-90	< 10

10.2.5.5 Método de cálculo:

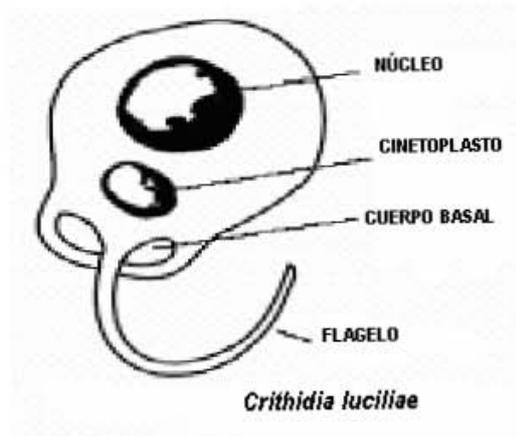
La curva de calibración se grafica automáticamente por el equipo DSX (programa Revelation 5.15), que grafica la concentración de anticuerpos anti-ADNcd de cada calibrador en escala logarítmica en el eje de las ordenadas contra las DO a 450 nm (con filtro de referencia de 620 nm) en escala lineal en el eje de las abscisas. El título de anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs de controles y muestras diluidas se obtuvo interpolando en la curva de calibración. El límite de sensibilidad es de 1.0 U/mL, para los tres ensayos.

10.2.7 Detección de anticuerpos anti-ADNcd mediante Inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato *Crithidia luciliae*

10.2.6.1. Principio de la prueba:

Una prueba de detección para anticuerpos anti-ADNcd es la técnica de inmunofluorescencia indirecta que utiliza como sustrato al hemoflagelado no patógeno del humano, *Crithidia luciliae* (Cl), el cual posee una mitocondria gigante (cinetoplasto) (figura 1). El sustrato Cl que se encuentra adherido en la superficie de la laminilla, es reconocido por los controles y las muestras. Si hay anticuerpos formarían complejos estables. El resto de los componentes del suero son removidos mediante lavados. Los anticuerpos anti-IgG humanas (cadenas H y L) conjugados con FITC se adicionan a la reacción, las cuales se unen a los IgG's humanos presentes. Posteriormente se realiza un lavado para remover el exceso de conjugado que no se une. Este resultado es positivo si la muestra presenta una tinción verde en el microscopio de epifluorescencia. Para conocer el título de las muestras se usó el sistema Image Titer® de Rhigene Inc, el cual es un instrumento que permite la titulación virtual de las muestras, el principio de la titulación es por la simulación de la titulación teniendo múltiples imágenes de una curva de la dilución de la muestra con una cámara digital y un sistema de obturador. Antes de conocer los títulos de las muestras, el sistema grafica una curva estándar con una serie de diluciones de un suero calibrador. Cada imagen del calibrador diluido usa una serie de tiempos de exposición. La imagen elegida es la que corresponde al punto final en la curva de calibración.

Figura 1._ Estructura del hemoflagelado *Crithidia luciliae*



10.2.6.3 Manejo y almacenamiento:

Una vez iniciados los ensayos, las muestras se conservaron entre 2-8 °C, al resguardo de la luz y antes de iniciar el ensayo las muestras y los reactivos se dejaron a temperatura ambiente 30 minutos. Las laminillas se sacaron de su empaque 15 minutos antes de su uso, y se colocaron en una cámara húmeda.

10.2.6.3 Procedimiento:

Fabricante: Rhigene Inc. Primero se realizó la dilución de tamizado de las muestras (1:10) adicionando 10 μL de la muestra en 100 μL de diluyente para muestras. La preparación de la curva estándar se realizó de acuerdo a las diluciones presentadas en la tabla 1:

Tabla 1._ Diluciones para la curva de calibración:

Preparación	Dilución
Calibrador sin diluir	1:10
(20 μ L del la dilución anterior+60 μ L de PBS)	1:40
(20 μ L del la dilución anterior+60 μ L de PBS)	1:160
(20 μ L del la dilución anterior+60 μ L de PBS)	1:640

Se colocaron 20 μ L de los controles, calibradores y muestras diluidas en los pozos de una laminilla, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS (pH 7.4 ± 0.2). Enseguida se eliminó el exceso de PBS y se adicionaron 20 μ L del conjugado (anticuerpo anti-IgG humana unido a FITC) y se incubó 20 minutos, realizando posteriormente un paso de lavados. Se eliminó el exceso de PBS y se colocó una gota en cada pozo de medio de montaje y se tapó con cubreobjetos. Las laminillas permanecieron en la cámara húmeda y en oscuridad hasta el momento de su lectura. Para la lectura se abrió la aplicación de Windows para ImageTiter, se colocó la laminilla con la curva de calibración en la platina del microscopio usando el objetivo de 40X. La imagen se observó en foco y clara. Se buscó para titular un área representativa en cada uno de los pozos. Cuando terminó la calibración el sistema traza una curva estándar con los puntos. Posteriormente se abre el modo de titulación, se identificaba cada muestra según su colación en la laminilla. Si la muestra es positiva se procederá a su titulación, capturando el campo representativo. La imagen titulada de la muestra aparece en el monitor y se elige el título en el punto en donde se ve el patrón definido. Las muestras superiores al valor estándar de 1:1280, se reportan como mayores a 1:1280.

10.2.6.3 Control de Calidad:

La media de error de la curva de calibración debe ser menor de 2.00 para que la calibración sea válida. En cada ensayo siempre se incluyó un control positivo (figura 2) y un control negativo (figura 3). Estos controles fueron revisados antes de leer las muestras. El control positivo debe tener una tinción verde intensa en el cinetoplasto, el control negativo se debe observar sin tinción o rojo en la misma estructura (debido al colorante de contraste que es el azul de Evans).

Figura 2._ Control positivo de *Crithidia luciliae*

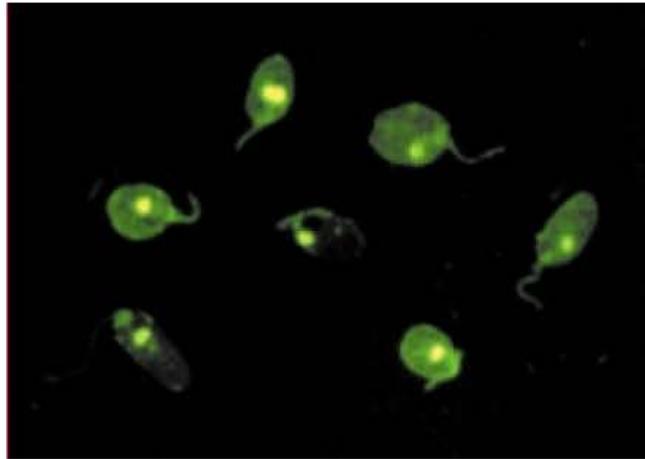
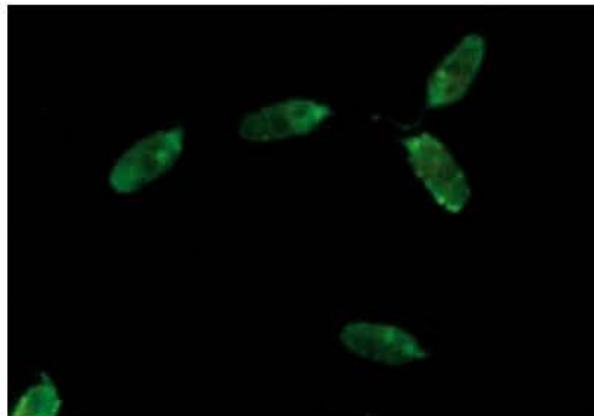


Figura 3._ Control negativo de *Crithidia luciliae*



10.2.7.1. Método de cálculo:

El equipo grafica la curva de calibración automáticamente por el sistema Image Titer® de Rhigene Inc, en donde el eje de las ordenadas representa un número de intensidad elegida y en el eje de las abscisas la dilución del calibrador del control de las muestras. El título de anticuerpos anti-nucleares se obtiene interpolando directamente en la curva. Se realizó una interpretación de los patrones observados en cada muestra. Cada muestra fue leída por más de un observador.

10.2.7 Detección de anticuerpos antinucleares mediante Inmunofluorescencia indirecta:

10.2.7.1. Principio de la prueba:

Los antígenos de las células HEP-2 adheridas en la superficie de la laminilla, son reconocidos por los anticuerpos presentes en los controles y las muestras. Si en los sueros hay anticuerpos presentes se unirán a su antígeno formando complejos estables. El resto de los componentes del suero son removidos mediante lavados. Posteriormente se adiciona un anticuerpo- anti IgG humana conjugado con FITC el cual se une al complejo formado anteriormente. Posterior a esto se realiza un lavado para remover el exceso de conjugado que reacciona. El resultado es positivo si la muestra presenta una fluorescencia verde, la curva se observa en un microscopio de epifluorescencia. La identificación del título de las muestras se describió en el apartado anterior. Antes de conocer los títulos de las muestras, el sistema traza una curva estándar con una serie de diluciones de un suero calibrador. Cada pozo del calibrador diluido muestra la imagen en una serie de tiempos de exposición. La imagen se elige de acuerdo a que el patrón este bien definido y que las células del campo se vean completas.

10.2.7.4. Manejo y almacenamiento:

Una vez iniciados los ensayos las muestras se conservaron entre 2-8 °C, al resguardo de la luz y antes de iniciar el ensayo, las muestras y los reactivos se dejaron a temperatura ambiente 30 minutos. Las laminillas se sacaron de su empaque 15 minutos antes de su uso y se colocaron en cámara húmeda.

10.2.7.2. Procedimiento:

Fabricante: Rhigene Inc. Primero se realizó la dilución de tamizado en las muestras (1:40) adicionando 2.5 µL de la muestra en 100 µL de diluyente para muestras. La preparación de la curva estándar se realiza de acuerdo a las diluciones presentadas en la tabla 2:

Tabla 2._ Diluciones para la curva de calibración

Preparación	Dilución
(25µL del Calibrador + 25µL de PBS)	1:40
(25µL del la dilución anterior+25µL PBS)	1:80
(25µL del la dilución anterior+25µL PBS)	1:160
(25µL del la dilución anterior+25µL PBS)	1:320
(25µL del la dilución anterior+25µL PBS)	1:640
(25µL del la dilución anterior+25µL PBS)	1:1280
(25µL del la dilución anterior+25µL PBS)	1:2560
(25µL del la dilución anterior+25µL PBS)	1:5120

Se colocaron 20 μL de los controles, calibradores y muestras diluidas en los pozos correspondientes. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS (pH 7.4 ± 0.2). Enseguida se eliminó el exceso de PBS y se adicionaron 20 μL del conjugado anti-IgG humana unido con FITC y se incubó por 20 minutos, realizando posteriormente un segundo lavado. Se eliminó el exceso de PBS y se colocó una gota en cada pozo del medio de montaje y se cubrió con un cubreobjetos. Las laminillas permanecieron en la cámara húmeda y en oscuridad hasta el momento de su lectura. Para hacer la lectura se abrió la aplicación de Windows para el ImageTiter®, se colocó la laminilla con la curva de calibración en la platina del microscopio, y se usó el objetivo de 40X. Cuando la imagen se observa en foco y clara, se buscó para titular un área representativa en cada uno de los pozos. Cuando se terminó la calibración el sistema graficó una curva estándar de los puntos calibrados. Se abrió el modo de titulación y se identifica cada muestra según su colocación en la laminilla. Si la muestra era positiva se procedió a titularla, capturando el campo representativo con la imagen de la cámara. La imagen titulada de la muestra aparece en el monitor y se elige el título en el máximo punto en donde se ve el patrón bien definido. Las muestras con títulos más altos que 1:5120, se reportaron como mayores a 1:5120.

10.2.7.3. Control de Calidad:

La media de error de la curva de calibración debe ser menor de 2.00 para que la calibración sea válida. En cada ensayo siempre se incluyó un control positivo (patrón homogéneo, figura 4) y un control negativo (figura 5). Estos controles fueron revisados antes de leer las muestras. En el control positivo se debe observar un patrón homogéneo con intensidad alta, y el control negativo se debe observar rojo (debido al colorante de contraste azul de Evans).

Figura 4._ Control positivo de células HEp-2

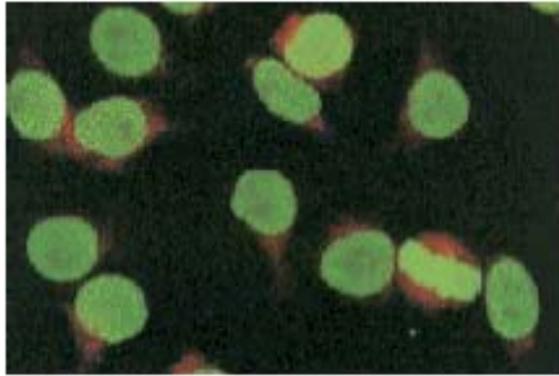
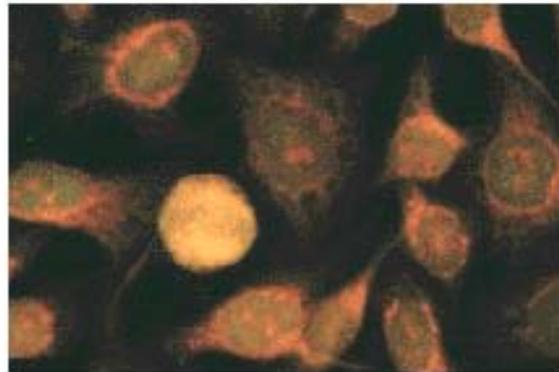


Figura 5._ Control negativo de células HEp-2



10.2.7.4. Método de cálculo:

La curva de calibración se grafica automáticamente por el sistema Image Titer® de Rhigene Inc, en donde el eje de las ordenadas son las unidades de intensidad, y el eje de las abscisas las diluciones del calibrador. El título de anticuerpos anti-nucleares se obtuvo interpolando directamente en la curva. Se realizó una interpretación de los patrones observados en cada muestra.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se usó el programa SPSS versión 13.0. Se realizaron los análisis de frecuencia y estadística descriptiva. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), y razón de momios (RM) se calculó para cada prueba, usando tablas de contingencia dos por dos. Los puntos de corte de los anticuerpos anti-ADNcd, anti-ADNcs, anti-nucleosoma y anti-histona (todos de isotipo IgG), fueron determinados usando curvas ROC, basados en la intersección de sensibilidad y especificidad.

Para las comparaciones de las variables se emplearon las pruebas de U de Mann Whitney y exacta de Fisher, límites de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Para determinar la correlación de las pruebas para detectar anticuerpos anti-ADNcd, anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs se utilizó la correlación de Spearman Rho, y para la inmunofluorescencia usando como sustrato C/ se utilizó el coeficiente de correlación de Phi.

12. RESULTADOS

12.1. Características de los sujetos estudiados:

12.1.1. Sujetos Sanos:

Se estudiaron 102 sujetos sanos, con una media de edad de 35.6 ± 11.9 años, de los cuales 67 fueron mujeres.

12.1.2. Pacientes con LEG:

Se estudiaron 98 pacientes, 56 activos (SLEDAI-2k \geq 3) con una media de edad de 34.5 ± 11.1 años, de los cuales 50 fueron mujeres y 42 inactivos (SLEDAI-2k \leq 2) con una media de edad de 37.8 ± 12.1 años, de los cuales 38 fueron mujeres. La media del tiempo de evolución de la enfermedad fue de 85.11 ± 79.6 meses.

12.2. Características de las pruebas para detectar anticuerpos anti-cromatina

Las características de las pruebas se resumen en la tabla 3, el procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

Tabla 3._ Características de las pruebas para detectar anticuerpos anti-cromatina:

Anticuerpo anti-	Métodos	Sustrato	Conjugado	Medición
ADNcd	ELISA-E y ELISA-C	ADNcd de timo de ternera	Anti-IgG humana/peroxidasa	Cuantitativa (IU/mL)*
ADNcd	RIA	ADNcd de <i>E. coli</i>	No se utiliza	Cuantitativa (IU/mL)*
ADNcd	IFI sustrato <i>C/</i>	ADNcd	Anti-IgG humana/FITC	Semi-Cuantitativa Titulo
Nucleosoma	ELISA	Nucleosoma recombinante	Anti-IgG humana/peroxidasa	Cuantitativa (U/mL)
Hstona	ELISA	Histonas purificadas H1, H2A, H2B, H3 y H4	Anti-IgG humana/peroxidasa	Cuantitativa (U/mL)
ADNcs	ELISA	ADNcs recombinante	Anti-IgG humana/peroxidasa	Cuantitativa (U/mL)

* Calibradas con suero Wo/80

12.3. Comparación de las pruebas para detectar anti-ADNcd de isotipo IgG, anti-ADNcs, anti-nucleosomas y anti-histonas

La comparación de los títulos de anticuerpos anti-cromatina detectados en sujetos control y pacientes con LEG, se muestra en la tabla 4.

Tabla 4._ Comparación entre sujetos control y pacientes con LEG.

Prueba	Z	p
ELISA-E	-9.363	p<0.0001
ELISA-C	-5.856	p<0.0001
Farr RIA	-9.457	p<0.0001
Anti-nucleosoma	-10.846	p<0.0001
Anti-ADNcs	-0.118	p<0.0001
Anti-Histonas	-5.5590	p=0.906

Como se puede ver solo en los títulos de anticuerpos anti-histonas no existen diferencias entre ambos grupos ($z = -0.118$, $p = 0.906$).

En la tabla 5 se muestran la media, desviaciones estándar, límites máximo y mínimo de los títulos observados con las pruebas de Farr (RIA), ELISA-E, ELISA-C, anticuerpos anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas, en sujetos sanos.

Tabla 5._ Sujetos Sanos.

	Media \pm desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
ELISA-E	12.0 \pm 4.6 IU/mL	6.8 IU/mL	31.0 IU/mL
ELISA-C	9.5 \pm 4.5 IU/mL	7.7 IU/mL	52.9 IU/mL

Farr (RIA)	10.0±0.4 IU/mL	10.0 IU/mL	13.8 IU/mL
Anticuerpos anti-nucleosomas	11.6±24.6 u/mL	5.2 U/mL	243.8 U/mL
Anticuerpos anti-ADNcs	16.6±14.5 U/mL	8.9 U/mL	123.9 U/mL
Anticuerpos anti-histonas	29.0±21.1 U/mL	7.9 U/mL	137.3 U/mL

En la tabla 6 se muestran la media, desviación estándar, límites máximo y mínimo de los títulos observados con las pruebas de Farr (RIA), ELISA-E, ELISA-C, anticuerpos anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas, en pacientes con LEG.

Tabla 6._ Pacientes con LEG

	Media± desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
ELISA-E	249.3±484.9 IU/mL	6.8 IU/mL	3124.0 IU/mL
ELISA-C	180.6±461.0 IU/mL	7.5 IU/mL	2084.6 IU/mL
Farr (RIA)	36.3±61.2 IU/mL	3 IU/mL	316 IU/mL
Anticuerpos anti-nucleosomas	487.9±1218.5 U/mL	6.3 U/mL	10260.0 U/mL
Anticuerpos anti-ADNcs	69.5±99.7 U/mL	5.6 U/mL	424.4 U/mL
Anticuerpos anti-histonas	109.2±157.3 U/mL	7.9 U/mL	945.2 U/mL

Las tablas 7 y 8 muestran el análisis de correlación de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por el ELISA-E, ELISA-C y Farr (RIA), en los dos grupos de estudio. El análisis entre el ELISA-E, ELISA-C vs Farr (RIA) no muestra una relación lineal en el grupo de sujetos sanos. La correlación entre el ELISA-E y ELISA-C fue de $r_s = 0.204$. En el grupo de pacientes con LEG se observaron los mejores coeficientes de correlación. La correlación del ELISA-C con la prueba de Farr (RIA) fue

mayor ($r_s = 0.741$, $p < 0.01$) en comparación con el ELISA-E y la prueba de Farr (RIA) ($r_s = 0.711$, $p < 0.01$).

Tabla 7._ Coeficientes de correlación de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr (RIA) en sujetos sanos.

Grupo	Coeficientes de correlación		
	ELISA-E	ELISA-C	Farr (RIA)
ELISA-C	0.204*		
Farr (RIA)		¥	
ELISA-E			¥

* La correlación es significativa al 0.05
 ¥ No es significativa.

Tabla 8._ Coeficientes de correlación de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr (RIA) en pacientes con LEG.

Grupo	Coeficientes de correlación		
	ELISA-E	ELISA-C	Farr (RIA)
ELISA-C	0.763**		
Farr (RIA)		0.741**	
ELISA-E			0.711**

** La correlación es significativa al 0.01

Las tablas 9 y 10 muestran el análisis de correlación de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr (RIA), anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas en ambos grupos de estudio. Las pruebas para determinar los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas no mostraron una relación lineal con los títulos de los anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E y Farr (RIA), en el grupo de sujetos control. La prueba de Farr

(RIA) no correlacionó con los títulos de los anticuerpos anti-histonas, cuando se comparó por grupos (sujetos sanos y en pacientes con LEG).

En los sujetos sanos (tabla 9) la correlación es baja en todas las pruebas debido probablemente a la variabilidad de la detección de los títulos bajos de anticuerpos anti-cromatina. En el grupo de pacientes con LEG (tabla 10) los anticuerpos anti-histonas tienen baja concordancia con las pruebas de ELISA-E, ELISA-C, anti-nucleosomas y anti-ADNcs ($r_s = 0.222$, $p = 0.028$, $r_s = 0.241$ $p = 0.017$, $r_s = 0.334$ $p < 0.001$ y $r_s = 0.234$ $p = 0.020$, respectivamente). Es importante mencionar que en los pacientes con LEG los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-C y los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas muestran una alta correlación ($r_s = 0.768$, $p < 0.01$). Las correlaciones de los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas con las pruebas ELISA-E y Farr (RIA) son de $r_s = 0.735$, $p < 0.01$ y $r_s = 0.730$, $p < 0.01$, respectivamente. La baja correlación entre las pruebas se explica por que cada ensayo presenta diferentes antígenos y en ensayos con altas correlaciones, puede deberse a que en las muestras pueden coexistir diferentes anticuerpos y/o los anticuerpos pueden detectar epítopes compartidos.

Tabla 9._ Coeficientes de correlación de los títulos de anti-ADNcd (detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr RIA) anti-nucleosoma, anti-ADNcs y anti-histona en sujetos sanos.

	Anti-nucleosoma	Anti-histona	Anti-ADNcs
Farr (RIA)	¥	¥	¥
ELISA-C	¥	¥	¥
ELISA-E	0.334**	0.424**	0.281**
Anti-nucleosoma		¥	
Anti-histona			0.279**
Anti-ADNcs	0.382**		

* La correlación es significativa al 0.05
 ** La correlación es significativa al 0.01
 ¥ No es significativa

Tabla 10._ Coeficientes de correlación de los títulos de anti-ADNcd (detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr RIA) anti-nucleosoma, anti-ADNcs y anti-histona en pacientes con LEG.

	Anti-nucleosoma	Anti-histona	Anti-ADNcs
Farr (RIA)	0.730**	¥	0.620**
ELISA-C	0.768**	0.241*	0.577**
ELISA-E	0.735**	0.222*	0.646**
Anti-nucleosoma		0.334**	
Anti-histona			0.234*
Anti-ADNcs	0.596**		

* La correlación es significativa al 0.05
 ** La correlación es significativa al 0.01
 ¥ No es significativa

En sujetos sanos donde se presentan títulos bajos de anticuerpos anti-cromatina las correlaciones son bajas, a diferencia de los pacientes con LEG, donde las correlaciones son mejores, ya que estos presentaron títulos más altos de todos los anticuerpos anti-cromatina.

El la figura 6 y 7 se muestra la correlación entra las prueba de Farr (RIA) - ELISA-E y Farr (RIA) – ELISA -C, tomando en consideración tanto sujetos sanos como pacientes con LEG. Como se puede observar la correlación es alta a títulos bajos, no así a títulos medios y altos donde existe más dispersión, considerando ambos grupos el coeficiente es moderado ($r_s = 0.582$, $p < 0.01$ y $r_s = 0.558$, $p < 0.01$, respectivamente).

Figura 6._ Correlación entre Farr (RIA) y ELISA-E

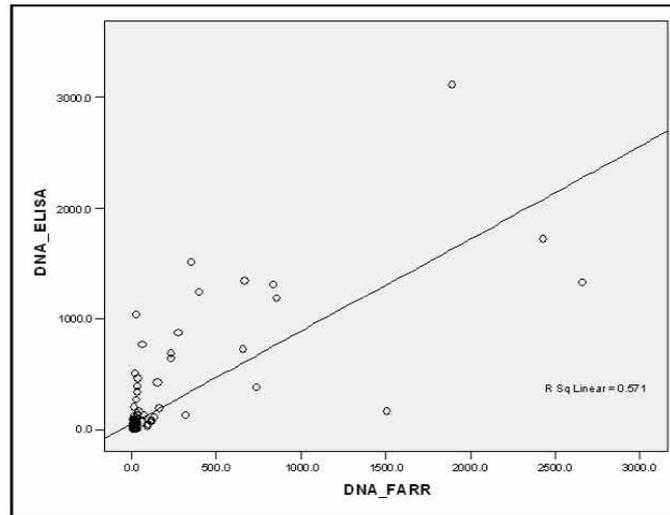
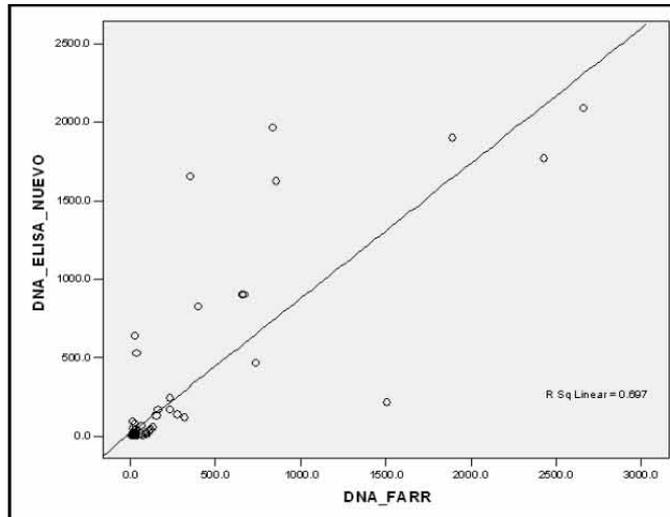
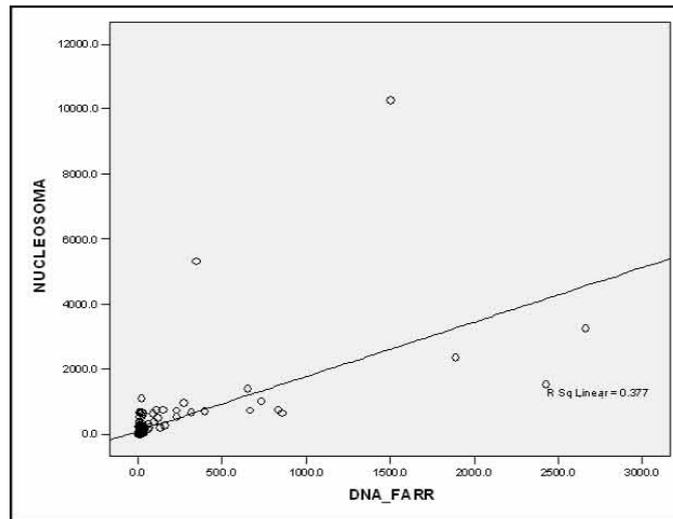


Figura 7._ Correlación entre Farr (RIA) y ELISA-C



El la figura 8 muestra la correlación entra las prueba de Farr RIA y anticuerpos anti-nucleosomas, tomando en consideración tanto sujetos sanos como pacientes con LEG, como se puede ver la correlación es la mas alta entre todas las pruebas ($r_s = 0.629$, $p < 0.01$).

Figura 8._ Correlación entre Farr (RIA) y anti-nucleosomas



En las figuras 9 y 10 se muestra la correlación entre las pruebas de Farr (RIA) vs los anticuerpos anti-ADNcs, anti-histonas, de sujetos sanos y pacientes con LEG, como se puede ver la correlación es moderada para anti-ADNcs ($r_s = 0.515$, $p < 0.01$) debido a que se pueden estar reconociendo epítopos compartidos de del ADNcd y el ADNcs, pero es baja para los títulos de anticuerpos anti-histona ($r_s = 0.237$, $p < 0.01$), lo que sugiere que son anticuerpos diferentes.

Figura 9._ Correlación entre Farr RIA y anti-ADNcs

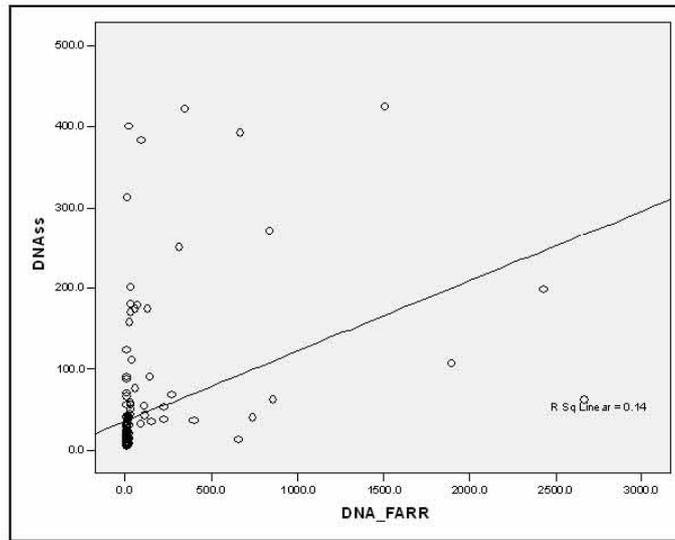
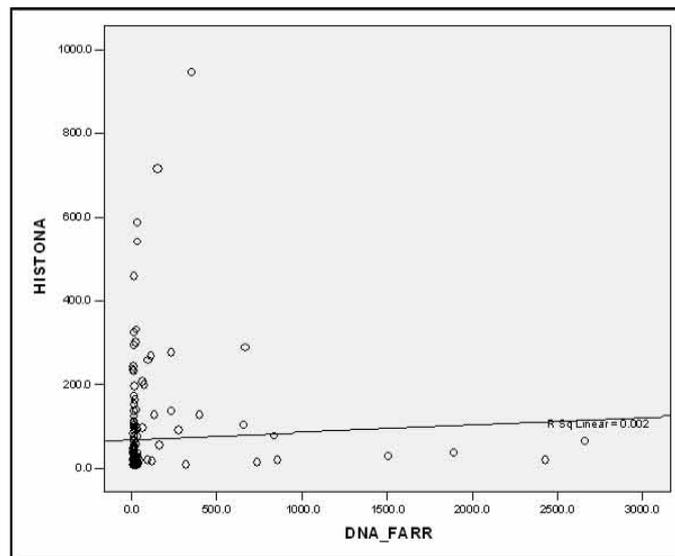


Figura 10._ Correlación entre Farr RIA y anti-histona



La comparación de la prueba de Farr (RIA) con la inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando como sustrato *Crithidia lucilae* (Cl), se muestra en la tabla 11.

Para los sujetos sanos todas las muestras (n = 102) fueron negativas por IFI sustrato CI. En los pacientes con LEG inactivos no hay una relación significativa, solo en los activos y esta es moderada ($r_s = 0.488$, $p < 0.05$). Para los pacientes con LEG sin tomar en cuenta la actividad la correlación es de $r_s = 0.363$, $p < 0.05$.

Tabla 11._ Coeficientes de correlación de los títulos de anti-ADNcd detectados por IFI sustrato CI y Farr RIA, en pacientes con LEG.

Grupo	Coeficientes de correlación r_s
	IFI sustrato CI y Farr RIA
Pacientes con LEG	0.363
Pacientes con LEG, activo	0.488
Pacientes con LEG, inactivo	¥

* La correlación es significativa al 0.05

** La correlación es significativa al 0.01

¥ No es significativa

12.4. Puntos de corte para la detección de anticuerpos anti-cromatina en la población mexicana estudiada

Para conocer el rendimiento global de cada prueba y elegir los puntos de corte se construyeron curvas ROC, en las cuales se graficó el valor complementario de la especificidad (eje de las abscisas), contra la sensibilidad (eje de las ordenadas). En el análisis de las curvas ROC el área bajo la curva (Abc) indica el rendimiento global de la prueba. De esta manera, entre mas se acerca el valor a 1.0 el rendimiento de la prueba es mayor, debido a que se tiene la mayor especificidad y sensibilidad. La figura 11 y 12 muestran las curvas ROC de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E y ELISA-C (Abc = 0.909 y 0.881, respectivamente) en los sueros de pacientes con LEG y controles sanos ambos mexicanos. La curva con mayor área es la del ELISA-E.

Figura 11. Curva ROC de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E, en sujetos sanos y pacientes con LEG.

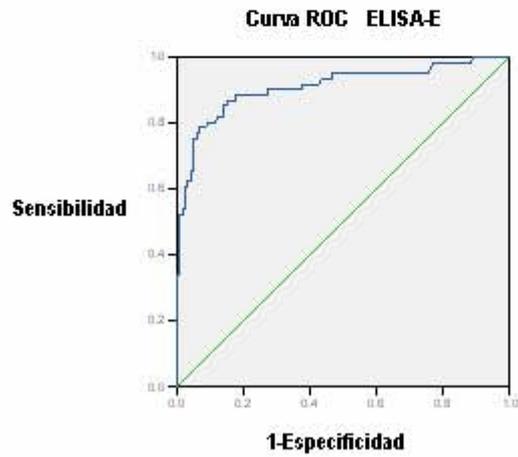
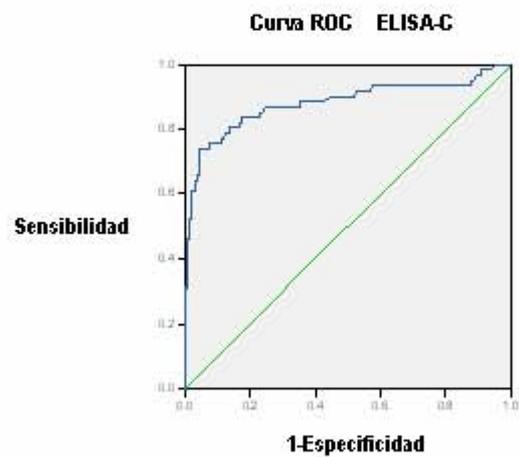


Figura 12._ Curva ROC de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-C, en sujetos sanos y pacientes con LEG



La figura 13, 14 y 15 muestra las curvas ROC para anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs (Abc = 0.949, 0.665 y 0.858, respectivamente). La curva con mayor rendimiento es la de anti-nucleosomas.

Figura 13._ Curvas ROC de anticuerpos anti-nucleosomas, en sujetos sanos y pacientes con LEG

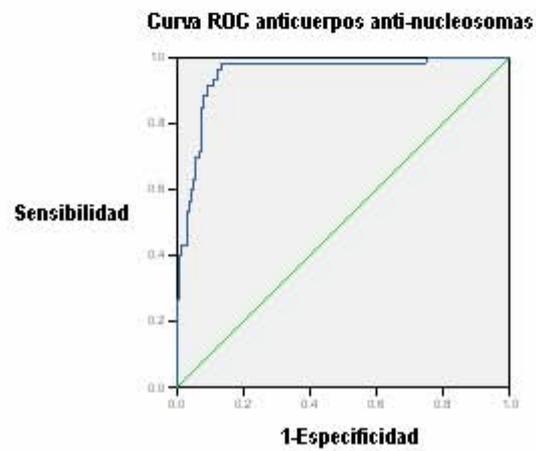


Figura 14._ Curvas ROC de anticuerpos anti-ADNcs, en sujetos sanos y pacientes con LEG.

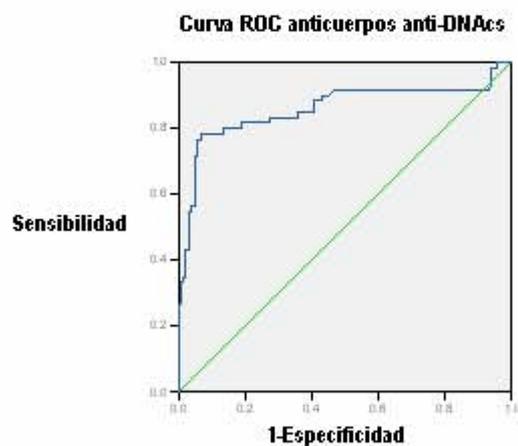
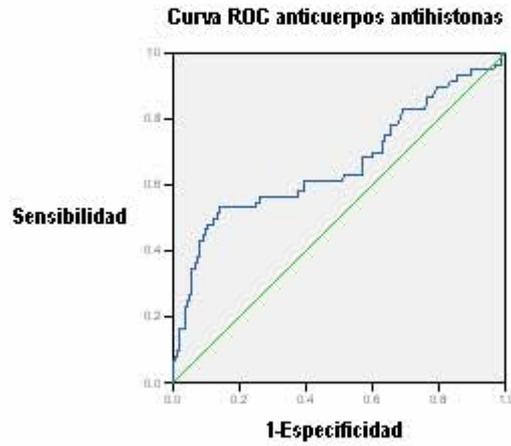


Figura 15._ Curvas ROC de anticuerpos anti-histonas, en sujetos sanos y pacientes con LEG



Con la prueba de Farr se obtuvo un punto de corte de 10 IU/mL (al 90% percentil), tomando en consideración a los sujetos sanos. La tabla 12 muestra los límites de referencia de los anticuerpos anti-cromatina obtenida del estudio de la población mexicana sana.

Tabla 12._ Límites de referencia del ELISA-E, ELISA C, anticuerpos anti nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas.

Prueba	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor de referencia
ELISA-E	85.2	85.6	23.3 IU/mL
ELISA-C	83.6	81.3	9.6 IU/mL
Anticuerpos anti-nucleosoma	90.0	90.9	71.9 U/mL
Anticuerpos anti-ADNcs	81.7	80.3	20.1 u/mL
Anticuerpos anti-histona	53.3	84.8	53.7 U/mL

Como se puede ver para el ELISA-E: el valor de referencia se estableció en 23.3 IU/mL. Con dicho valor la sensibilidad y especificidad de la prueba fue del 85.2 y 85.6 % respectivamente. Para el ELISA-C: se estableció el punto de corte en 9.6 IU/mL (sensibilidad: 83.6%, especificidad: 81.3%). Los puntos de corte de los anticuerpos anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas: se establecieron en 71.9, 20.1 y 53.7 U/mL respectivamente (sensibilidad: 90.0, 81.7, 53.3%; especificidad 90.9, 80.3 y 84.8 %).

12.5. Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de las pruebas y de todos los anticuerpos anti-cromatina se establecieron en sujetos sanos y en pacientes con LEG tanto activos como inactivos. Los resultados se calcularon en tablas de contingencia dos por dos. Las Tablas 13 y 14 muestran la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, en pacientes con LEG, del ELISA-E y el ELISA-C respectivamente.

Tabla 13._ Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del ELISA-E, para pacientes con LEG.

Grupo	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Pacientes con LEG	91.5	33.3	67.5	72.2
Pacientes con LEG, activos	92.7	20.0	76.0	50.0
Pacientes con LEG, inactivos	88.9	41.7	53.3	83.3

Tabla 14._ Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del ELISA-C, para pacientes con LEG.

Grupo	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Pacientes con LEG	79.7	79.5	85.5	72.1
Pacientes con LEG, activos	90.2	60.0	86.0	69.2
Pacientes con LEG, inactivos	55.6	91.7	83.3	73.3

Las Tablas 15, 16 y 17 muestran la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, en, pacientes con LEG, de la prueba para anticuerpos anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas respectivamente.

Tabla 15._ Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas, para pacientes con LEG

Grupo	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Pacientes con LEG	100.0	25.6	67.0	100.0
Pacientes con LEG, activos	100.0	20.0	77.4	100.0
Pacientes con LEG, inactivos	100.0	29.2	51.4	100.0

Tabla 16._ Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de los títulos de anticuerpos anti-ADNcs, para pacientes con LEG

Grupo	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Pacientes con LEG	78.0	74.4	82.1	69.0
Pacientes con LEG, activos	85.4	53.3	83.3	57.1
Pacientes con LEG, inactivos	61.1	87.5	78.6	75.0

Tabla 17._ Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de los títulos de anticuerpos anti-histonas, para pacientes con LEG

Grupo	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
Pacientes con LEG	54.2	71.8	74.4	50.9
Pacientes con LEG, activos	56.1	66.7	82.1	35.7
Pacientes con LEG, inactivos	50.0	75.0	60.0	66.7

En la tabla 18 se muestran los valores de sensibilidad y especificidad para los anticuerpos anti-cromatina, considerando el grupo de sujetos sanos y pacientes con LEG. La sensibilidad de la prueba de Farr (RIA) es de 60.2%, y de 68.4% para el ELISA-C. En general las pruebas para detectar anticuerpos anti-cromatina resultan ser más específicas que sensibles. Es importante que las pruebas sean específicas, y el ELISA-C tiene una especificidad de 95.1 %, mejor que la del ELISA-E (85.36%), y comparable con la de Farr (RIA, 98.0%). Por lo anterior podemos proponer a la prueba de ELISA-C para sustituir a la prueba de Farr (RIA).

Tabla 18._ Sensibilidad y especificidad en sujetos sanos y pacientes con LEG.

Grupo	Sensibilidad %	Especificidad %
Farr (RIA)	60.2	98.0
ELISA-E	63.3	85.3
ELISA-C	68.4	95.1
Anticuerpos anti-nucleosomas	66.3	98.9
Anticuerpos anti-ADNcs	62.2	85.1
Anticuerpos anti-histonas	43.9	90.4

12.6. Análisis de la correlación entre anticuerpos anti-cromatina y actividad en pacientes con LEG

En las tablas 19 y 20 se muestran los análisis de las correlaciones de los anticuerpos anti-cromatina detectados en pacientes con LEG inactivos (SLEDAI-2k ≤ 2) y activos (SLEDAI-2k >3). Los coeficientes de correlación mas altos se observaron en los pacientes activos con las pruebas de ELISA-E y ELISA-C ($r_s = 0.854$ $p < 0.01$). Para el ELISA-C y la prueba de Farr el coeficiente fue de $r_s = 0.791$, $p < 0.01$. En

general los coeficientes en los pacientes con LEG inactivos tuvieron un comportamiento bajo en todas las pruebas.

Tabla 19._ Coeficientes de correlación de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr RIA en pacientes con LEG activo.

Grupo	Coeficientes de correlación		
	ELISA-E	ELISA-C	Farr (RIA)
ELISA-C	0.854**		
Farr (RIA)		0.791**	
ELISA-E			0.717**

** La correlación es significativa al 0.01

Tabla 20._ Coeficientes de correlación de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr (RIA) en pacientes con LEG inactivo.

Grupo	Coeficientes de correlación		
	ELISA-E	ELISA-C	Farr (RIA)
ELISA-C	0.381*		
Farr (RIA)		0.527**	
ELISA-E			0.592**

* La correlación es significativa al 0.05

** La correlación es significativa al 0.01

Las tablas 21 y 22 muestran el análisis de correlación de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd (detectados por el ELISA-E, ELISA-C y Farr), anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas en pacientes con LEG activo e inactivo, respectivamente. La correlación es mayor en los pacientes activos, contra los inactivos. La prueba de anticuerpos anti-histonas no tuvo correlación con otra prueba. La mejor correlación

observada fue entre el ELISA-C y los anticuerpos anti-nucleosomas ($r_s = 0.840$, $p < 0.05$). La prueba de Farr mostró mejor correlación con la prueba de anticuerpos anti-nucleosomas ($r_s = 0.767$, $p < 0.05$).

Tabla 21._ Coeficientes de correlación de los títulos de anti-ADNcd (detectados por ELISA-E, ELISA-C, Farr (RIA), anti-nucleosoma, anti-ADNcs y anti-histona en pacientes con LEG activo.

	Anti-nucleosoma	Anti-histona	Anti-ADNcs
Farr (RIA)	0.767**	¥	0.572**
ELISA-C	0.840**	¥	0.500**
ELISA-E	0.770**	¥	0.494**
Anti-nucleosoma		¥	
Anti-histona			¥
Anti-ADNcs	0.524**		

** La correlación es significativa al 0.01
 ¥ No es significativa

Tabla 22._ Coeficientes de correlación de los títulos de anti-ADNcd (detectados por ELISA-E, ELISA-C, Farr (RIA), anti-nucleosoma, anti-ADNcs y anti-histona en pacientes con LEG inactivo.

	Anti-nucleosoma	Anti-histona	Anti-ADNcs
Farr (RIA)	0.625**	¥	0.466**
ELISA-C	0.546**	0.392**	0.366**
ELISA-E	0.439**	¥	0.494**
Anti-nucleosoma		0.485**	
Anti-histona			¥*
Anti-ADNcs	0.455**		

** La correlación es significativa al 0.01
 ¥ No es significativa

De las tablas de contingencia de dos por dos, los pacientes con LEG activos e inactivos, se obtuvo el cálculo de la razón de momios (“odds ratio”, RM) para las pruebas de Farr (RIA), ELISA-E, ELISA-C, así como la razón de verosimilitud (RV). Los resultados se muestran en la tabla 23, el ELISA-C mostró una probabilidad mayor relacionada con la actividad del LEG, así como una RV más alta que la prueba de Farr (RIA).

Tabla 23. RM y RV para los títulos de anti-ADNcd (detectados por ELISA-E, ELISA-C y Farr (RIA) en pacientes activos e inactivos

	RM , intervalo de confianza 95%	RV %
Farr RIA	3.6 (1.6-8.5) p=0.002	66.3
ELISA-E	3.3 (1.1-9.8) p=0.023	63.3
ELISA-C	8.3 (3.3-20.6) p<0.0001	74.5

13. DISCUSIÓN

Una parte importante en el diagnóstico por el laboratorio de las enfermedades autoinmunes como el LEG, es la detección de los anticuerpos anti-ADNcd. Su cuantificación y por tanto la validación del ensayo inmunoenzimático caitrópico (ELISA-C) son importantes para detectarlos. Para este fin, se tomó la prueba de Farr Radioinmunoensayo (RIA) como estándar, ya que en la literatura reportan su correlación con la actividad en pacientes con LEG y su uso para el monitoreo de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd. Sin embargo la prueba de Farr presenta el inconveniente de usar radioisótopos (^{125}I , ^{14}C o ^3H), el resultado del estudio tarda 8 horas mínimo y no permite identificar el isotipo de las inmunoglobulinas detectadas. En nuestro trabajo detectamos, los sueros anticuerpos anti-cromatina mediante el ELISA.

En general los procedimientos para el ensayo inmunoenzimático estándar (ELISA-E, prueba de rutina realizada en el laboratorio de inmunología del INNSZ, para la cuantificación de anticuerpos anti-ADNcd) y para el ELISA-C, son muy similares, con la única diferencia que la solución de lavado de esta última presenta alta concentración de sales, lo que influye en la unión antígeno-anticuerpo eliminando a los anticuerpos que son de baja avidéz. Cabe mencionar que dentro de las características de las pruebas para determinar los títulos de anticuerpos anti-ADNcd, la fuente del antígeno es un factor de variación importante. En el caso del antígeno para detectar los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas se excluye la histonas H1, y los anticuerpos reaccionan preferentemente contra el complejo ADNcd-histonas (H2A-H2B), en contraste con el antígeno para detectar los anticuerpos anti-histonas el cual comprende una mezcla completa de histonas desnaturalizadas.

Los anticuerpos anti-histonas son frecuentes en LEG y en LEG inducido por fármacos, así como en otras enfermedades autoinmunes y no autoinmunes. Sin embargo son considerados como no específicos y tienen poca utilidad en la práctica clínica. En este estudio dichos anticuerpos no mostraron diferencia significativa al comparar el grupo de sujetos sanos con el de pacientes con LEG. Los títulos de anticuerpos detectados por las pruebas del ELISA-E, ELISA-C, Farr (RIA), anticuerpos anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas fueron significativos en los pacientes con LEG cuando se comparo con los sujetos sanos (tabla 4).

En relación a los coeficientes de correlación en pacientes con LEG, el ELISA-C y la prueba de Farr (RIA), tienen un coeficiente de correlación ($r_s = 0.741$, $p < 0.01$), muy similar a la correlación con el ELISA-E ($r_s = 0.711$, $p < 0.01$). ELISA-E y ELISA-C tienen una correlación de $r_s = 0.763$, $p < 0.01$. Al observar estas comparaciones entre las pruebas mencionadas, se puede inferir que la diferencia radica en que en la prueba del ELISA-C, la solución de lavado tiene alta concentración de sales lo cual hace que se desprendan los anticuerpos de baja avidéz de la placa sensibilizada con ADNcd .

El ELISA-E y ELISA-C mostraron correlación baja en los sujetos sanos ($r_s = 0.0.204$, $p < 0.05$), debido a que en la prueba de ELISA-C los títulos de anticuerpos anti-ADNcd en este grupo tienden a ser mas bajos y la dispersión es mayor. Cuando se compara el ELISA-E y ELISA-C con la prueba de Farr (RIA) no se observó correlación entre los sujetos sanos.

La comparación con los títulos de anticuerpos anti-nucleosomas y la prueba de Farr (RIA), muestran buena correlación ($r_s = 0.730$, $p < 0.01$), en contraste con los títulos de anticuerpos anti-ADNcs que tienen una correlación menor ($r_s = 0.620$,

$p < 0.01$); lo anterior confirma la participación de los anticuerpos anti-nucleosomas en la patogénesis LEG.

Nuestros datos muestran que en los sujetos sanos, donde se tienen títulos bajos de anticuerpos anti-ADNcd (por ELISA-C, ELISA-E y Farr RIA), anti-nucleosomas, anti-ADNcs y anti-histonas, las correlaciones son bajas. En los casos en que no hay correlación entre pruebas es por que las pruebas son contra antígenos diferentes.

La correlación de las pruebas de Farr (RIA) con el ELISA-E y el ELISA-C, en ambos grupos), es baja $r_s = 0.582$, $p < 0.01$, $r_s = 0.0558$, $p < 0.01$ respectivamente como se observa en la figura 1 y 2. Esto es debido a que en los sujetos sanos solo el 2% son positivos para anticuerpos anti-ADNcd por Farr RIA.

La correlación entre anti-ADNcd y anti-nucleosomas es la mayor de las pruebas ($r_s = 0.0558$, $p < 0.01$). Lo anterior confirma su utilidad en el diagnóstico y seguimiento en los pacientes con LEG. La correlación del Farr RIA con los anticuerpos anti-histona, también es baja y no se observa una tendencia lineal.

La prueba de Farr (RIA) en comparación con la inmunofluorescencia (IFI) usando como sustrato *Crithidia luciliae* (Cl), tiene una correlación muy baja en los pacientes con LEG activos e inactivos. Por lo cual consideramos que no es adecuada para su utilización en el laboratorio y presenta la desventaja de que la persona que realiza la lectura debe contar con experiencia.

El establecimiento de los puntos de corte se hizo mediante curvas ROC, con la mayor especificidad y sensibilidad para cada una de las pruebas. Cabe

mencionar que la curva ROC para anticuerpos anti-nucleosomas, mostró un punto de corte de 71.9 U/mL, con una sensibilidad de 90.0 % y una especificidad de 90.9 %, y fue la curva con mayor rendimiento (área bajo la curva = 0.949).

La sensibilidad para el ELISA-C en pacientes con LEG es razonable (79.7%), es decir que la prueba tiene una buena capacidad para detectar anticuerpos anti-ADNcd, cuando los pacientes tienen LEG, y su especificidad es similar (79.5%), que se traduce en la capacidad de identificar la ausencia de anticuerpos anti-ADNcd, cuando los pacientes no tienen LEG. En comparación con el ELISA-E, el cual tiene una sensibilidad de 91.55%, pero su especificidad es muy baja 33.3%, con lo que puede dar resultados positivos en individuales que no tienen anticuerpos anti-ADNcd. Los VPP y VPN se mantienen razonablemente altos en ambas pruebas (ELISA-E y ELISA-C). Esta tendencia se observa en el grupo de pacientes activos e inactivos con LEG.

La sensibilidad del Farr (RIA) considerando ambos grupos de estudio (60.25) es menor que en el ELISA-C (68.4%), y la especificidad es alta para ambos (98.0 y 95.1% respectivamente). La prueba de Farr RIA vs ELISA-C muestra una correlación alta en pacientes con LEG activos ($r_s = 0.791$, $p < 0.01$) y con poca diferencia en comparación con el ELISA-E ($r_s = 0.717$, $p < 0.01$), lo cual pone en evidencia, las características de ambos ensayos los cuales permiten detectar actividad en los pacientes con LEG. La correlación entre los ELISA-E y ELISA-C es elevada ($r_s = 0.854$; $p < 0.01$). La RM para las pruebas de Farr RIA y ELISA-C muestra que en esta última prueba, una persona con LEG tiene mayor probabilidad de presentar actividad (definida por el SLEDAI-2k) cuando los anticuerpos anti-ADNcd detectados mediante el ELISA-C, son positivos que cuando la prueba de Farr (RIA) es positiva. La RV del ELISA-C es la mas alta (74.5%), en comparación con la prueba de Farr (RIA, 66.3) y el

ELISA-E (63.3%), y por tanto el ELISA-C tiene mas exactitud para detectar actividad en pacientes con LEG.

14. CONCLUSIONES

- 1) Se observó una alta correlación entre el ELISA-C y el método de Farr para la detección de anticuerpos anti-ADNcd en los sueros de los pacientes con LEG. Observamos además una baja correlación entre la prueba de Farr y la inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato *Crithidia luciliae*.
- 2) Se establecieron los puntos de corte de los títulos de anticuerpos anti-ADNcd detectados con las pruebas de Farr (RIA) (10 IU/mL), ELISA-E y ELISA-C (23.3 y 9.6 IU/mL respectivamente), anticuerpos anti-nucleosomas, (71.9 IU/mL), anti-histonas (53.7 IU/mL) y anti-ADNcs (20.1 IU/mL) en una población sana de México.
- 3) Se determinó la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de las pruebas de Farr RIA, ELISA-E y ELISA-C, anticuerpos anti-nucleosomas, anti-histonas y anti-ADNcs.
- 4) Nuestros resultados muestran que existe una alta correlación ($r_s = 0.791$) entre el ELISA-C, la prueba de Farr (RIA) y actividad de la enfermedad en pacientes con LEG.
- 5) Por su sensibilidad y especificidad para detectar la actividad en pacientes con LEG el ELISA-C es una prueba que puede sustituir a la prueba de Farr. Aunado a lo anterior, el ELISA-C tiene otras características (menor costo, resultados en menor tiempo, no genera residuos de difícil y costoso manejo) que hacen de la prueba una mejor opción para la detección de los anticuerpos anti-ADNcd.

16. Anexos

ABREVIATURAS

AAN: Anticuerpos antinucleares

ACR: Colegio Americano de Reumatología

Anti-ADNcd: Anticuerpos contra ácido Desoxirribonucleico de cadena doble

Anti-ADNcs: Anticuerpos contra ácido Desoxirribonucleico de cadena sencilla

Anti-histonas: Anticuerpos contra histonas

Anti-nucleosomas: Anticuerpos contra nucleosomas

Cl: *Crithidia luciliae*

ADNcd: Ácido Desoxirribonucleico de cadena doble

ADNcs: Ácido Desoxirribonucleico de cadena sencilla

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático

ELISA-C: Ensayo Inmunoenzimático Caiotrópico, Farrzyme®

ELISA-E: Ensayo Inmunoenzimático estándar, Bindazyme®

ENA: Antígenos extraíbles del núcleo

FITC: Isocianato de fluoresceína

HRP: Peroxidasa de rábano picante

ID: Inmunodifusión

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

LEG: Lupus eritematoso generalizado

DO: Densidades ópticas

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

RIA: Radioinmunoanálisis o radioinmunoensayo

RNA: Ácido ribonucleico

ROC: Receiver operator characteristic curve

TA: Temperatura ambiente

TBS: The Binding Site®

TMB: 3,3',5,5' tetrametilbencidina

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

WHO: Organización Mundial de la Salud

- Psicosis.....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
- 10._ Daño hematológico:
- Anemia hemolítica.....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
 - Leucopenia (menos de 4000/uL).....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
 - Linfopenia (menos de 1500/uL).....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
 - Trombocitopenia (menos de 100.000 uL).....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
- 11._ Trastornos inmunitarios:
- Ac. Anti-ADNcd.....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
 - Ac. Anti-Sm.....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
 - Ac. Anti-cardiolipina.....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
 - Células LE.....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /
- 12._ Anticuerpos antinucleares.....si no no dato Fecha: /__ / __ / ____ /

No de criterios: _____

Medicamentos

Prednisona.....Dosis/ _____ /mg/día

Bolos de Metilprednisona..... No. De bolos _____
 Dosis/ _____ /mg
 Fecha del ultimo bolo: /__ / __ / ____ /

Inmunosupresores

Bolos de ciclofosfamida VI..... No. De bolos _____
 Dosis/ _____ /mg
 Fecha del ultimo bolo: /__ / __ / ____ /

Ciclofosfamida VO.....Dosis/ _____ /mg /día
 Azatropina..... Dosis/ _____ /mg /día
 Methotrexate..... Dosis/ _____ /mg/día
 C1q o Hc1q..... Dosis/ _____ /mg/día
 Mofetil Micofelonato..... Dosis/ _____ /mg/día
 Ciclosporina.....Dosis/ _____ /mg/día

AINE

Especificar tipo y dosis..... _____
 Dosis/ _____ /mg/día

Otro

Especificar tipo y dosis..... _____
 Dosis/ _____ /mg /día

SLEDAI- 2 K ^{42,43}

Se tomara en consideración la presencia de el hallazgo (variable), si este esta presente en el momento de la evaluación o su ocurrencia en los últimos 10 días.

	Puntuación	Hallazgo	Descripción
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	8	Convulsiones	Inicio reciente, excluyéndose causas metabólicas infecciosas o por drogas.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	8	Psicosis	Capacidad alterada para funcionar en una actividad cotidiana debido a trastorno grave de la percepción de la realidad. Incluyen: alucinaciones, incoherencia, perdida marcada de asociaciones, contenido de pensamiento pobre, pensamiento ilógico, conducta bizarra, catatónica o notoriamente desorganizada. Excluyéndose presencia de uremia y drogas que puedan inducir psicosis.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	8	Síndrome orgánico cerebral	Función mental alterada con pérdida de la orientación, memoria u otra función intelectual de inicio reciente y rápido, con características clínicas fluctuantes. Tales como: a) alteraciones de la conciencia, con la incapacidad para mantener la atención en el medioambiente. En adición de al menos 2 de los siguientes hallazgos: alteración perceptual, lenguaje incoherente, insomnio o somnolencia diurna, aumento o disminución de la actividad psicomotora. Excluyéndose causas metabólicas, infecciosas y secundarias a drogas.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	8	Alteraciones visuales	Cambios retinianos del LEG, incluyen: cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos o hemorrágicos en la coroides, o neuritis óptica. Excluyéndose hipertensión, infecciones y secundarios a drogas.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	8	Alteraciones de pares craneales	Neuropatía motora o sensorial de inicio reciente que afecta a los pares craneales.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	8	Cefalea lúpica	Cefalea persistente y severa, puede ser de características migrañosa, que no responde a la analgesia con narcóticos.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	8	ECV	Enfermedad cerebrovascular de inicio reciente, excluyéndose como causa la aterosclerosis.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	4	Vasculitis	Úlceras, gangrena, vasculitis en el pulpejo del dedo, infartos periungueal, hemorragias en astilla. Presencia de biopsia o angiografía diagnóstica de vasculitis.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	4	Artritis	2 o mas articulaciones dolorosas y con signos de inflamación.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	4	Miositis	Mialgia y debilidad muscular proximal, asociadas a elevación de CPK/aldolasa o cambios electromiograficos o biopsia que demuestre miositis.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	4	Cilindros urinarios	Presencia de cilindros eritrocitarios o granulosos.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	4	Hematuria	Mas de 5 eritrocitos por campos de alto poder. Excluyéndose causas infecciosas, litiasis u otras.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	4	Proteinuria	Mayor a 0.5 g / 24 horas.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2	Piuria	Mas de 5 leucocitos por campo de lata resolución, excluyendo infección.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2	Eritema	Eritema de características inflamatorias.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2	Alopecia	Perdida anormal, en parches o difuso, del cabello.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2	Úlceras orofaríngeas	Úlceras orales o nasales.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2	Pleuresía	Historia de dolor torácico de características pleuríticas o la presencia de frote pleural o derrame pleural al examen físico.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2	Pericarditis	Historia de dolor de características pericárdicas y al menos 1 de los siguientes apartados: frote pericardico, derrame o confirmación electrocardiográfica o ecocardiográfica.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2	Hipocomplementemia	Descenso del CH50, C3 o C4, según las referencias del laboratorio.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	1	Incremento en la captación DNA	Incremento en la captación de DNA por ensayo Farr, por encima de los rangos normales.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	1	Fiebre	Mayor de 38 grados, excluyéndose infección.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	1	Trombocitopenia	Menor de 100.000 /x 10 ⁹ / L, excluyéndose las causadas por drogas.
si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	1	Leucopenia	Menor de 3.000 /x 10 ⁹ / L, excluyéndose las causadas por drogas
Total:			

Mex-SLEDAI 44,45

La calificación del índice clínico MEX-SLEDAI es la suma total de los puntos de cada variable. Se toma en consideración la presencia de el hallazgo (variable), si este esta presente en el momento de la evaluación o su ocurrencia en los últimos 10 días.

Calificación	Descriptor	Definición
8	Trastorno neurológico: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<p><u>Psicosis</u>: Capacidad alterada para funcionar en una actividad cotidiana debido a trastorno grave de la percepción de la realidad. Incluyen: alucinaciones, incoherencia, pérdida marcada de asociaciones, contenido de pensamiento pobre, pensamiento ilógico, conducta bizarra, catatónica o notoriamente desorganizada. Excluyéndose presencia de uremia y drogas que puedan inducir psicosis.</p> <p><u>EVC</u>: Enfermedad cerebrovascular de inicio reciente, excluyéndose como causa la aterosclerosis.</p> <p><u>Convulsiones</u>: Inicio reciente, excluyéndose causas metabólicas infecciosas o por drogas.</p> <p><u>Síndrome orgánico cerebral</u>: Función mental alterada con pérdida de la orientación, memoria u otra función intelectual de inicio reciente y rápido, con características clínicas fluctuantes. Tales como: a) alteraciones de la conciencia, con la incapacidad para mantener la atención en el medioambiente. En adición de al menos 2 de los siguientes hallazgos: alteración perceptual, lenguaje incoherente, insomnio o somnolencia diurna, aumento o disminución de la actividad psicomotora. Excluyéndose causas metabólicas, infecciosas y secundarias a drogas.</p> <p><u>Mononeuritis</u>: déficit sensorial o motor de inicio reciente, en uno o más de los nervios craneales o periféricos.</p> <p><u>Mielitis</u>: Paraplejia de inicio reciente y/o alteración del control de la vejiga y/o de intestino. Excluyéndose otras causas.</p>
6	Trastorno renal: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<p><u>Cilindros urinarios</u>: presencia de cilindros eritrocitarios o granulosos.</p> <p><u>Hematuria</u>: mas de 5 eritrocitos por campos de alto poder. Excluyéndose causas infecciosas, litiasis u otras.</p> <p><u>Proteinuria</u>: mayor a 0.5 g / 24 horas.</p> <p><u>Retención azoada</u>: aumento de la creatinina mayor a 5 mg/dl</p>
4	Vasculitis: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<u>Vasculitis</u> : úlceras, gangrena, vasculitis en el pulpejo del dedo, infartos periungueal, hemorragias en astilla. Presencia de biopsia o angiografía diagnóstica de vasculitis.
3	Hemólisis: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> Trombocitopenia: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<p><u>Hemólisis</u>: hemoglobina menor de 12 mg/dL y reticulocitosis corregidos mayor del 3 %.</p> <p><u>Plaquetas</u>: menor de 100.000 / x 10⁹/ L, excluyéndose las causadas por drogas.</p>
3	Miositis: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	Mialgia y debilidad muscular proximal, asociadas a elevación de CPK o cambios electromiográficos o biopsia que demuestre miositis.
2	Artritis: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	2 o mas articulaciones dolorosas y con signos de inflamación o derrame articular.
2	Afección mucocutánea: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<p><u>Eritema malar</u>: de inicio reciente o aumento en su recurrencia.</p> <p><u>Úlceras en mucosas</u>: de inicio reciente o recurrencia de ulceraciones orales o nasofaríngeas.</p> <p><u>Alopecia</u>: áreas de alopecia difusa o caída fácil del cabello</p>
2	Serositis: si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<p><u>Pleuritis</u>: historia contundente de dolor pleurítico, frote pleural o derrame pleural.</p> <p><u>Pericarditis</u>: historia contundente de dolor pericardico o frote pleural, frote o derrame pleura al examen físico.</p> <p><u>Peritonitis</u>: dolor abdominal difuso con rebote ligero (se excluye enfermedad intraabdominal).</p>
1	Fiebre si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> Fatiga si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<p>Mayor de 38 grados, excluyéndose infección.</p> <p>Cansancio inexplicable.</p>
1	Leucopenia si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> Linfopenia si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/>	<p><u>Leucocitos</u>: menor de 4.000 mm³, excluyéndose las causadas por drogas.</p> <p><u>Linfocitos</u>: menor de 1.200 mm³, excluyéndose las acusadas por drogas.</p>

Total:	
--------	--

Índice de daño para LEG: SLICC/ACR ⁴⁶

Daño (Cambio no reversible, no asociado a inflamación activa, ocurrido desde el inicio de LEG, confirmado por exámenes clínicos y presente por al menos 6 meses, amenos que se señale lo contrario. Episodios repetidos separados durante los últimos seis meses la calificación es de 2. La misma lesión no puede tener doble calificación.

Ítem	Calificación
Ocular (en cada ojo, por examen clínico)	
Presencia de catarata	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Daño en retina o atrofia óptica	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Neuropsiquiátrico	
Alteración cognoscitiva	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Convulsiones Clónicas con Tratamiento durante 6 meses	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Accidente cerebro vascular (califica 2 si > 1)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Neuropatía craneal o periférica (excluye óptica)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> (2)
Mielitis transversal	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
	1
Renal	
Filtración glomerular < 50%	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Proteinuria ≥ 3.5 g/24 h	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Insuficiencia renal crónica terminal (independiente de diálisis o trasplante)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Pulmonar	
Hipertensión pulmonar (crecimiento ventricular o soplo P2)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Fibrosis pulmonar (físico y radiológico)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Frote pulmonar (Radiografía)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Fibrosis plural (Radiografía)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Infarto pulmonar (Radiografía)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Cardiovascular	
Angina o bypass coronario	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Infarto agudo al miocardio (califica 2 si > 1)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1 (2)
Cardiomiopatía (disfunción ventricular)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Enfermedad valvular	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Pericarditis por 6 meses o pericardietocmia	
Vascular Periférico	
Claudicación durante 6 meses	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Perdida de tejido menor(pulpejos)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Perdida de significante de tejido (amputación) (califica 2 si > 1)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1 (2)
Trombosis venosa con tumefacción, ulceración o estasis	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Gastrointestinal	
Infarto intestinal o resección intestinal, bazo, hígado vesícula	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1 (2)
por cualquier causa (califica 2 si > 1)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Infarto mesentérico	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Peritonitis crónica	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Cirugía del tracto gastrointestinal superior	
Músculo-Esquelético	
Atrofia o debilidad muscular	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Artritis deformante o erosiva (excluye necrosis avascular)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Osteoporosis con fracturas o colapso vertebral (excluye necrosis avascular)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Necrosis avascular (califica 2 si > 1)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Osteomielitis	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> (2)
	1
Piel	
Alopecia crónica cicatrizal	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Cicatrización extensiva o panículo, como en cuero cabelludo y pulpejos	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Ulceración de piel (excluye trombosis) > a 6 meses	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Insuficiencia gonadal prematura	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Diabetes (independiente de tratamiento)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
Malignidad (excluye displasias) (califica 2 si > 1lugar)	si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no dato <input type="checkbox"/> 1
	(2)
Total :	

15. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol.* 2000 Jun;53(6):424-32.
- ² Liang MH, Fortin PR, Isenberg DA, Snaith L. Quantitative clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus: progress report and research agenda. *Rheumatol Int.* 1991;11(3):133-6.
- ³ Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982 Nov;25(11):1271-7.
- ⁴ Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.
- ⁵ Werle E, Blazek M, Fiehn W. The clinical significance of measuring different anti-dsDNA antibodies by using the Farr assay, an enzyme immunoassay and a *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. *Lupus.* 1992 Dec;1(6):369-77.
- ⁶ Farr RS. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I-BSA and antibody. *J. Infect Dis* 1958; 103:239-62.
- ⁷ Hargraves. M., Richomod M., Morton R., Presentacion of two bone marrow elements. The "tart" cell and "LE" cell. *Mayo Clin Proc.* 1948: 23: 25-28.
- ⁸ Friou GJ., Clinical aplicación oof lupus serum. Nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique (abstract) *J Clin Invest.* 1957:36:890.
- ⁹ Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1966 Mar;96(3):464-71.
- ¹⁰ Pisetsky D.D., *Rheumatic Disease Clinics of North America. Antinuclear Antibodies.* W.B. Saunders Company, Mayo 1992: Volumen 18, Número 2.
- ¹¹ Berden JH. Lupus nephritis. *Kidney Int.* 1997 Aug;52(2):538-58. Review.
- ¹² Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med.* 1993 May 1;177(5):1367-81.
- ¹³ Miescher P, Strassler R. New serological methods for the detection of the L.E. factor. *Vox Sang.* 1957 Sep;2(4):283-7.
- ¹⁴ Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957 Dec;96(3):572-4.
- ¹⁵ Robbins Wc, Holman Hr, Deicher H, Kunkel Hg. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957 Dec;96(3):575-9.
- ¹⁶ Seeligmann M., Evidence in the serum with systemic lupus erythematosus of a substance producing a precipitacion reaction with DNA. *C. R. Soc Biol (Paris)* 1957: 245: 328-333.
- ¹⁷ Emlen W, Pisetsky DS, Taylor RP. Antibodies to DNA. A perspective. *Arthritis Rheum.* 1986 Dec;29(12):1417-26. Review.

- ¹⁸ Ebling F, Hahn BH. Restricted subpopulations of DNA antibodies in kidneys of mice with systemic lupus. Comparison of antibodies in serum and renal eluates. *Arthritis Rheum.* 1980 Apr;23(4):392-403.
- ¹⁹ Winfield JB, Faiferman I, Koffler D. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 1977 Jan;59(1):90-6.
- ²⁰ Serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus: a discordance between clinical and serologic features. *Am J Med.* 1979 Feb;66(2):210-5.
- ²¹ P.H. Schur, J. Sandson, Immunological factors and clinical activity in lupus erythematosus, *N. Engl. J. Med.* 278 (1968) 533–538.
- ²² N.F. Rothfield, D. Stollar, The relation of immunoglobulin class, pattern of antinuclear antibody and complement fixing antibodies to DNA in sera from patients with Systemic Lupus Erythematosus, *J. Clin. Invest.* 46 (1967) 1785– 1795.
- ²³ Isenberg DA, Ducheny C, Williams W *et al.* Measurement of anti-DNA antibodies: a reappraisal using . ve methods. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 448 – 456.
- ²⁴ Smeenk RJT. Measurement of antibodies to DNA. In Venrooij MJv, Maini RN (eds). *Manual of Biological Markers of Disease.* Kluwer Academic: Dordrecht , 1993, A8, pp 1 – 12.
- ²⁵ Smeenk R, Brinkman K, Van den Brink H, Swaak T. A comparison of assays used for the detection of antibodies to DNA. *Clin Rheumatol* 1990; 9(Suppl 1): 63 – 72.
- ²⁶ Brinkman K, Termaat R-M, Brink HGvd, Berden JHM, Smeenk RJT. The speci. city of the anti-dsDNA ELISA. A closer look. *J Immunol Meth* 1991; 139: 91 – 100.
- ²⁷ Hylkema MN, Huygen H, Kramers C, Wal ThJvd, Jong Jd, Bruggen. MCJv *et al.* Clinical evaluation of a modi. ed ELISA, using photobiotinylated DNA, for the detection of anti-DNA antibodies. *J Immunol Meth* 1994; 170: 93 – 102.
- ²⁸ World, R.T. Young, F.E. Tan, E.M., Farr, R.S. Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid. *Science*, 19489, 161, 806-807.
- ²⁹ Maini, R.N. Holborow, E.J. Detection and measurement of anti-DNA antibodies. *Ann Rheum Dis*, 1977, 36S
- ³⁰ Aarden LA, Lakmaker F, Feltkamp TE. Immunology of DNA. I. The effect of size and structure of the antigen on the Farr-assay. *J Immunol Methods.* 1976;10:39-48..
- ³¹ Aarden L.A. , Smeek, R. Immunochemical properties of antibodies to DNA and their influence on detection methods. In: *Antibodies to nuclear antigens.* Editor: Kelden, J.R. Feltkamp T.E.W., Amsterdam, Excerpta Medica, 1982, 23-28.
- ³² Gripenberg M, Helve T. Anti-DNA antibodies of IgA class in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1986;6:53–5.

- ³³ Avina-Zubieta JA, Galindo-Rodriguez G, Kwan-Yeung L, *et al.* Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies. *Lupus* 1995;4:370–4.
- ³⁴ Ehrenstein MR, Swana M, Keeling D, *et al.* Anti-DNA antibodies in the primary antiphospholipid syndrome (PAPS) [see comments]. *Br J Rheumatol* 1993;32:362–5.
- ³⁵ Hylkema MN, Bruggen MCJv, Hove Tt, Jong Jd, Swaak AJG, Berden JHM *et al.* Histone-containing immune complexes are to a large extent responsible for anti-dsDNA reactivity in the Farr assay of active SLE patients. *J Autoimmun* 2000; 14: 159 – 168.
- ³⁶ Gauthier VJ, Tyler LN, Mannik M. Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *J Immunol* 1996;156:1151–6.
- ³⁷ Amoura Z, Koutpuzoz S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, *et al.* Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2000;43:76–84.
- ³⁸ Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, *et al.* Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002;117:316–24.
- ³⁹ Gompertz NR, Isenberg DA, Turner BM. Correlation between clinical features of systemic lupus erythematosus and levels of antihistone antibodies of the IgG, IgA, and IgM isotypes. *Ann Rheum Dis.* 1990 Jul;49(7):524-7.
- ⁴⁰ Bernstein RM, Hobbs RN, Lea DJ, Ward DJ, Hughes GR. Patterns of antihistone antibody specificity in systemic rheumatic disease. I Systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease, primary sicca syndrome, and rheumatoid arthritis with vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1985 Mar;28(3):285-93.
- ⁴¹ Costa O, Monier JC. Antihistone antibodies detected by ELISA and immunoblotting in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1986 Aug;13(4):722-5.
- ⁴² Gohill J, Cary PD, Couppez M, Fritzler MJ. Antibodies from patients with drug-induced and idiopathic lupus erythematosus react with epitopes restricted to the amino and carboxyl termini of histone. *J Immunol.* 1985 Nov;135(5):3116-21.
- ⁴³ Konstantinov K, Russanova V, Russeva V. Antibodies to histones and disease activity in systemic lupus erythematosus: a comparative study with an enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch Dermatol Res.* 1986;278(5):410-5.
- ⁴⁴ Portanova JP, Arndt RE, Tan EM, Kotzin BL. Anti-histone antibodies in idiopathic and drug-induced lupus recognize distinct intrahistone regions.. *J Immunol.* 1987 Jan 15;138(2):446-51.
- ⁴⁵ Totoritis MC, Tan EM, McNally EM, Rubin RL. Association of antibody to histone complex H2A-H2B with symptomatic procainamide-induced lupus. *N Engl J Med.* 1988 Jun 2;318(22):1431-6. Erratum in: *N Engl J Med* 1988 Jul 28;319(4):256.
- ⁴⁶ Rubin RL, McNally EM, Nusinow SR, Robinson CA, Tan EM. IgG antibodies to the histone complex H2A-H2B characterize procainamide-induced lupus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985 Jul;36(1):49-59.

⁴⁷ Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002 Feb;29(2):288-291.

⁴⁸ Uribe AG, Vila LM, McGwin G Jr, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcon GS. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2004 Oct;31(10):1934-1940.

⁴⁹ Salinas A, Cardiel MH, Guzmán J, Alcocer-Varela J. Validity of retrospective disease activity assessment in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996;23:846-849.

⁵⁰ Uribe AG, Vila LM, McGwin G Jr, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcon GS. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2004 Oct;31(10):1934-1940.

⁵¹ Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, Isenberg D, Jones J, Kalunian K, Maddison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996 Mar;39(3):363-9.