



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA
Y NEUROCIRUGÍA
"MANUEL VELASCO SUÁREZ"

BÚSQUEDA DE ANTICUERPOS ANTINEURONALES
EN PACIENTES CON SÍNDROMES NEUROLÓGICOS
DE CAUSA DESCONOCIDA Y PROBABLE ORIGEN
PARANEOPLÁSICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN NEUROLOGÍA
P R E S E N T A :

DRA. MÓNICA SARAY RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

TUTORA DE TESIS:
DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ

MÉXICO, D.F.

ENERO 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

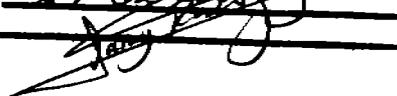
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Mónica Dany Rodríguez

FECHA: 29-02-2008

FIRMA: 

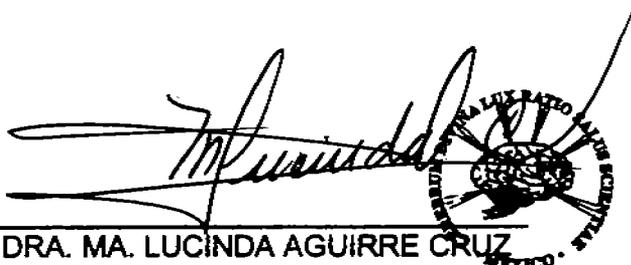
FIRMAS



DR. RICARDO COLIN PIANA
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DR. FERNANDO ZERMEÑO PÖHLS
PROFESOR TITULAR CURSO NEUROLOGÍA



DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ
TUTORA DE TESIS

**INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA
DIRECCION DE ENSEÑANZA**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su amor, comprensión y apoyo durante toda mi carrera y por ser el gran ejemplo a seguir...

A Alfredo por ser la luz de mi vida...

A mis maestros Dr. Zermeño, Dr. Guerrero, Dr. Márquez, Dr. Amaya, Dr. Briceño, Dr. López, Dr. Arauz, Dr. Violante, Dr. Leyva, Dr. Santos, Dr. Gómez-Llata y Dr. Miranda.

A mis amigos incondicionales Marite, Dany, Carlitos, Luisa, Anita, Sara, Luis, Gina y Lupita.

A mi tutora la Dra.Ma. Lucinda Aguirre y a la Dra. Daniela Masetto por su apoyo, paciencia y motivación para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros residentes por los momentos que compartimos juntos.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía " Manuel Velasco Suárez" por brindarme la oportunidad de hacer de mi sueño una realidad.

-P

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS, vi.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS, vii.

SUMMARY, viii.

RESUMEN, ix.

I. Introducción, 1.

II. Hipótesis, 12.

III. Objetivo, 12.

IV. Justificación, 13.

V. Material y Métodos, 13.

A. Población de estudio, 13.

B. Diseño de estudio, 14.

C. Muestra biológica, 14

D. Obtención de tejido de cerebelos de ratas para la determinación de auto-anticuerpos anti-neuronales, 15.

E. Determinación de autoanticuerpos antineuronales, 15.

F. Análisis Inmunohistoquímico para la detección de autoanticuerpos antineuronales, 15.

VI. Resultados, 16.

i. Características de la muestra

ii. Resultado de la determinación de auto-anticuerpos anti-neuronales.

VII. Discusión, 24.

VIII. Conclusiones, 25.

IX. Referencias, 26.

X. Anexos, 31.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNP: Síndromes neurológicos paraneoplásicos.

ANNA: Anticuerpos anti-neuronales.

TAC: Tomografía axial computarizada.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PBS: Solución reguladora de fosfatos.

ABC KIT: Avidina- Biotina-Peroxidasa.

VIP: Substrato KIT para peroxidasa.

EMG: Electromiografía.

CPCP: Cáncer de células pequeñas de pulmón.

SHR: Síndrome del hombre rígido.

EL: Encefalitis límbica.

Anti-GAD: Autoanticuerpo antineuronal glutamato descarboxilasa.

INSERM: Instituto Nacional de la Salud y la Investigación Médica.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Características clínicas de los síndromes neurológicos paraneoplásicos y su correlación con anticuerpos antineuronales, **10.**
- Tabla 2.** Revisión de casos de pacientes con síndromes neurológicos de causa desconocida y probable origen paraneoplásicos, **11.**
- Tabla 3.** Criterios de inclusión, **14**
- Tabla 4.** Criterios de exclusión, **14**
- Tabla 5.** SNP, autoanticuerpos y tumores asociados en la muestra, **18.**

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Marcaje inmunohistoquímico anti-Hu, **19.**
- Fig. 2.** Marcaje inmunohistoquímico anti-Ri, **20.**
- Fig. 3.** Marcaje inmunohistoquímico anti-Yo, **21.**
- Fig. 4.** Marcaje inmunohistoquímico del control negativo, **22.**
- Fig. 5** Marcaje inmunohistoquímico anti-GAD, **23.**

SUMMARY

Background. The diagnosis of paraneoplastic neurological syndromes (SNP) is complex and the determination of the onconeural autoantibodies associated to them is required to establish their diagnosis. The determination of this kind of antibodies is not standardized in Mexico. The finding of onconeural autoantibodies is very important because they indicate to the clinician the presence of a hidden cancer.

Purpose. To search for the presence of onconeural autoantibodies in the sera of Mexican patients with neurological alterations that cannot be explained by an infectious, vascular, traumatic, metabolic, nutritional or hereditary cause.

Material and Methods. Twenty seven patients were recruited (15 men and 12 women) from March to December 2007 from three National Hospitals. Their signed consent to participate in the essay were obtained. A peripheral blood sample was extracted to them and the determination of autoantibodies was made by immunochemistry. The patterns of labeling given for each serum were obtained on rat cerebellum slides. Syndromes and presence of autoantibodies were correlated.

Results. The 27 patients had neurological alterations without a definite diagnosis, twelve (44.4%) had polineuropathy; eight cerebellar degeneration (29.6%); Three, limbic encefalitis (11.1%); 1, opsoclonus-myoclonus (4%); 1. Stiffman syndrome (4%); 1. encephalomyelitis; and 1. necrotizant myelopathy (4%). Five over 12 (41.6%) anti-Hu positives had polineuropathy; three over eighth with cerebellar degeneration were anti-Yo positives (37.5%); and four were negative. Two over three with limbic encefalitis were positive to anti-Hu and one was negative. The most frequent cancers associated to the onconeural autoantibody anti-Hu were the carcinoma of small cells of lung and the adenocarcinome of breast. The autoantibody anti-Yo was associated to ovary, breast and gastric carcinoma. A patient with Stiffman syndrome had anti-GAD autoantibody. An unexpected finding was the positivity of anti-Ri autoantibody in a patient with polyneuropathy. It is important to mention that several patients with cancer were negatives for the presence of autoantibodies. Some patient had superposition of symptoms.

Conclusions. At the present work we demonstrate the presence of onconeural autoantibodies in Mexican patients with neurological syndromes of undetermined etiology.

RESUMEN

Antecedentes. Los síndromes neurológicos paraneoplásicos son entidades complejas de difícil diagnóstico, que pueden afectar cualquier parte del sistema nervioso. Su diagnóstico efectivo y precoz se asocia a la presencia de autoanticuerpos onconeuronales. Sin embargo, los métodos para detectar tales anticuerpos no han sido estandarizados en México. La importancia de los autoanticuerpos onconeuronales es que su hallazgo orienta al clínico a la búsqueda de un cáncer incipiente oculto y potencialmente tratable, del cual no existe evidencia clínica.

Objetivos. Buscar la presencia de autoanticuerpos onconeuronales en el suero de pacientes con alteraciones neurológicas que no puedan ser explicadas por una causa infecciosa, vascular, traumática, metabólica, nutricional o hereditaria, provenientes de los Institutos Nacionales de Neurología, Cancerología y Enfermedades Respiratorias.

Material y Métodos. Se reclutaron 27 pacientes (15 hombres y 12 mujeres), de marzo a diciembre del 2007. Se obtuvo su consentimiento informado para participar en el estudio. Se les extrajo una muestra de sangre periférica y se les realizó la determinación de autoanticuerpos onconeuronales por inmunohistoquímica. Se identificaron los patrones de marcaje revelados por el suero de cada paciente sobre cortes de cerebelo de rata. Se diagnosticaron los síndromes neurológicos en los pacientes y se relacionaron con el tipo de autoanticuerpo detectado en su suero.

Resultados. Los 27 pacientes reclutados tuvieron alteraciones neurológicas de causa no determinada. Doce de ellos tuvieron polineuropatía (44.4%); 8, degeneración cerebelosa (29.6%); 3, encefalitis límbica (11.1%); 1, opsoclonus-mioclonus (4%); 1, síndrome del hombre rígido (4%); 1, encefalomiелitis; 1, mielopatía necrotizante (4%). De los que tuvieron polineuropatía (12), cinco (41.6%) fueron positivos a anti-Hu y uno (8.3%) a anti-Yo; de los pacientes con degeneración cerebelosa (8), tres fueron positivos a anti-Yo y cuatro fueron negativos. De los pacientes con encefalitis límbica (3), dos (66%) fueron positivos a anti-Hu y 1 fue negativo. Los cánceres que con mayor frecuencia se asociaron a la presencia del autoanticuerpo anti-Hu fueron el carcinoma de células pequeñas de pulmón y el adenocarcinoma de mama. Un paciente con clínica del hombre rígido presentó autoanticuerpos anti-GAD, el cual no se asoció a ningún cáncer. Un dato inesperado fue la positividad del autoanticuerpo anti-Ri en un paciente con polineuropatía. También es importante mencionar que se obtuvo negatividad para autoanticuerpos en pacientes con clínica de SNP que ya tenían diagnóstico de cáncer, lo cual coincide con lo estipulado en la literatura. Algunos pacientes presentaron sintomatología mixta. Los SNP aparecen bien caracterizados en su presentación clínica; sin embargo, su diagnóstico es complejo.

Conclusiones. En este estudio demostramos la presencia de autoanticuerpos antineuronales en mexicanos con síndromes neurológicos de etiología no definida, que se correlacionaron con la evolución y el cuadro clínico.

I. INTRODUCCIÓN

Los síndromes neurológicos paraneoplásicos (SNP) son un grupo heterogéneo de trastornos causados por cánceres no localizados en el sistema nervioso central que no son el resultado de metástasis, infecciones, eventos cerebrovasculares, alteraciones metabólicas o nutricionales o por efecto secundario del tratamiento de tumores (Damell, 1996).

Los signos y síntomas de los SNP son diversos, pero comparten algunas características en común. Generalmente, los síntomas neurológicos aparecen meses o años antes de que se identifique el cáncer. Los síndromes neurológicos son generalmente severos, discapacitantes y algunas veces letales.

Los SNP son mediados inmunológicamente y resultan de la presencia de anticuerpos anti-neuronales que tienen reacción cruzada con proteínas tumorales similares a antígenos del sistema nervioso. Estos anticuerpos constituyen herramientas diagnósticas valiosas para el clínico, sugiriendo una etiología auto-inmunitaria de los síntomas neurológicos y orientando al clínico a la posible existencia de un tumor fuera del sistema nervioso (Chávez, Ochoa y Fuentes, 2000).

Los SNP son raros, se presentan en menos del 1% de pacientes con cánceres. No obstante, en los pacientes con el síndrome de Lambert-Eaton su incidencia puede ir de 3% a 15% (Dalmay y Posner, 1997). Si bien cada vez se diagnostican con mayor frecuencia que años atrás, en México no hay un registro epidemiológico de esta enfermedad debido a la dificultad diagnóstica y a la falta de un consenso para ello. Solo se tienen reporte de casos en Hospitales de Tercer nivel de atención (García, Gil y Jiménez, 2006).

Los autoanticuerpos fueron descritos inicialmente por Wilkinson y Zeromski en 1965, en 1982 fue identificado el anticuerpo anti-células de Purkinje por Greenlee y

Bracear en pacientes con síndrome de degeneración cerebelosa y malignidad ginecológica y a partir de entonces fueron apareciendo más auto-anticuerpos, posteriormente Lennon en 1989 introdujo el término de Anticuerpos anti-neuronal nuclear por la reactividad hacia el citoplasma de las neuronas y las clasificó en ANNA tipo "1" para el subgrupo de anti-Hu y tipo "2" para el subgrupo anti-Ri, basadas en la inmunohistoquímica correspondiente (Moll y Antoine, 1995).

Como ya se ha mencionado los SNP son raros, el cáncer de pulmón es el que más los ocasiona, debido a su infrecuencia originan confusión diagnóstica. El diagnóstico de los síndromes neurológicos paraneoplásicos es basado en el reconocimiento del síndrome neurológico, en la demostración de asociación con cáncer y la detección de auto anticuerpos específicos séricos o en el líquido cefalorraquídeo. Estos anticuerpos son de valor diagnóstico porque pueden orientar a la presencia de un cáncer, antes de que éste se manifieste clínicamente (Dropcho, 2005).

El manejo clínico de los pacientes con sospecha de SNP incluyen cuatro componentes: Verificar que el desorden es en efecto paraneoplásico, identificación de la asociación tumoral, tratamiento del tumor y supresión de los efectos autoinmunes que causan por daño neuronal (Rosenfeld y Dalmau, 2003).

El diagnóstico diferencial de pacientes con SNP depende del reconocimiento del tumor, algunos pacientes con disfunción neurológica y diagnóstico conocido de cáncer, el nivel de sospecha de un desorden paraneoplásico varía de acuerdo al patrón histológico del tumor, por ejemplo el carcinoma de células pequeñas de pulmón y el Linfoma de Hodgkin son los más frecuentemente asociados con SNP. Para los pacientes sin previo diagnóstico de cáncer, el nivel de sospecha de desarrollo de SNP depende de la edad, el género y diversos factores de riesgo principalmente el tabaquismo y del síndrome neurológico. Es por eso que el abordaje diagnóstico de

éstos pacientes debe realizarse con estudios como son Tomografía axial computarizada (TAC) o Imagen de resonancia magnética de tórax, abdomen, mamografía y examen pélvico en mujeres e incluso en pacientes en los que éstos estudios sean negativos para cáncer y no se detecten auto-anticuerpos en suero se debe de realizar estudio de Tomografía por emisión de positrones (PET) que puede demostrar una neoplasia en pacientes con sospecha de SNP.

Existe una correlación entre un SNP y un auto-anticuerpo específico y la asociación con el tipo de tumor. (tabla 1), Los anticuerpos antineuronales pueden ser utilizados como herramienta para el diagnóstico del SNP, la muestra sanguínea de anticuerpos antineuronales tiene importantes limitaciones en la práctica clínica, primero: un síndrome clínico puede estar asociado con uno o varios autoanticuerpos, y viceversa un autoanticuerpo puede estar asociado con una o varias presentaciones clínicas; segundo: para ciertos SNP pocos pacientes tienen altos títulos de anticuerpos antineuronales pero nunca desarrollan un tumor demostrable, y tercero algunos anticuerpos están presentes en pacientes con tumor sin manifestaciones neurológicas.

Finalmente pacientes con sospecha de SNP pueden no tener autoanticuerpos demostrables o pueden tener anticuerpos atípicos o incompletos que no son detectados en los ensayos realizados (Bataller y Antoine 1999).

Algunos de los autoanticuerpos antineuronales más conocidos son: el anti-Hu, asociado a la presencia de cáncer de células pequeñas de pulmón; el anti-Yo, asociado a cánceres ginecológicos; el anti-Ri, asociado a carcinoma de mama; y el anti-CV2, asociado a cáncer de pulmón o timo. No existen estudios de frecuencia de SNP en México y su diagnóstico requiere siempre de confirmación de los autoanticuerpos enviados al extranjero (Posner, 2003).

Sabemos que existe la determinación de estos anticuerpos antineuronales, sin embargo éstos no son realizados en nuestro país por la falta de insumos y por el alto costo que esto con lleva. El propósito de este estudio es corroborar la presencia de los anticuerpos antineuronales en pacientes con sospecha de SNP y determinar su utilidad en cuanto al diagnóstico oportuno del paciente para mejorar su pronóstico de vida.

A. Importancia de los anticuerpos antineuronales

La caracterización de los anticuerpos antineuronales en los pacientes con SNP ha tenido un impacto positivo en el campo de las neurociencias para el neurólogo clínico, permitiendo la identificación correcta tanto de desórdenes neurológicos como paraneoplásicos y dirigiendo la búsqueda de tumores específicos. Los neuropatólogos, utilizan estos autoanticuerpos para diferenciar los tumores cerebrales de origen neuronal de los gliomas más frecuentes. En el estudio de conceptos básicos en Neurociencias, los autoanticuerpos antineuronales han servido para identificar antígenos nerviosos, que desempeñan papeles neurofisiológicos importantes. La evidencia preliminar de que la respuesta inmune disparada por los antígenos nerviosos puede controlar la evolución tumoral, hace importante la búsqueda de mecanismos efectores de cáncer, sistema nervioso y sistema inmunitario que podrían servir de base para el desarrollo de nuevas herramientas profilácticas, diagnósticas y de tratamiento (Grauss y col., 2004).

Los SNP pueden afectar cualquier parte del sistema nervioso, causando daño a un área específica (encefalitis límbica) o a una célula específica (células de Purkinje) en diversos niveles. La frecuencia de presentación de estos síndromes varía en función de su tipo del cáncer asociado (Posner, 2003).

Los síndromes que involucran el sistema nervioso central son: encefalomielitis multifocal, degeneración cerebelosa, encefalitis límbica, opsoclonus-mioclonus, síndrome extrapiramidal, rombencefalitis, mielopatía necrotizante, enfermedad de motoneurona, síndrome de persona rígida, neuritis óptica; degeneración retiniana. Los SNP a nivel del sistema nervioso periférico incluyen: neuropatía sensitiva, polineuropatía sensitivomotora, neuropatía motora, neuromiotonía, insuficiencia autonómica, síndrome de Lambert-Eaton, miopatía inflamatoria y necrotizante (Dalmau y Posner, 1997).

La degeneración cerebelosa paraneoplásica (DCP) se caracteriza por el rápido desarrollo de una disfunción pancerebelosa grave. Se manifiesta clínicamente con ataxia troncal y apendicular, incoordinación de la marcha, disartria y disfagia, que se acompaña usualmente de vértigo y nistagmo. El inicio es subagudo, progresa de manera rápida en semanas a meses hasta causar invalidez severa y de hacer incomprendible el lenguaje (Mason y col., 1997). Se presenta con mayor frecuencia en mujeres y se asocia en un tercio de los casos a cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer de mama, ovario y enfermedad de Hodgkin (Cunningham y col., 1986).

Estudios de DCP ilustran claramente el beneficio de la combinación clínica y los resultados de laboratorio. Una relación entre degeneración cerebelosa paraneoplásica y cáncer ginecológico oculto, mama u ovario fue el primero en definirse en 1938 y fue publicado en Brain en 1951 (Cunningham y col., 1986). A mediados de 1980, Posner definió a los pacientes con DCP que podrían ser clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia de anticuerpos que reaccionan con antígenos presentes en ambos tumores, los cuales atacan a las células de Purkinje del cerebelo.

El anticuerpo antineuronal asociado a DCP y cáncer ginecológico es el anti-Yo, el cual se describió por primera vez en 1983 (Drlicek y col., 1997). Las proteínas Yo son

péptidos que se expresan normalmente en el citoplasma de las células de Purkinje, de 62 y 34 kD (Dropcho, 2005). Estos péptidos se unen al gen c-myc, lo cual sugiere una función reguladora del mismo. En la corteza cerebral de los pacientes con anti-Yo hay pérdida importante de células de Purkinje, lesiones en espacios perivasculares y adelgazamiento de la capa molecular y granular (Rosenblum y col., 1992).

Algunas condiciones clínicas que caracterizan a los SNP incluyen: encefalitis límbica evidenciada por ansiedad, depresión, alteración en la memoria, agitación, confusión, hipersomnias, alucinaciones y crisis convulsivas parciales o generalizadas; enfermedad de Hodgkin o timoma opsoclonus paraneoplásico —caracterizado por movimientos oculares conjugados, involuntarios y multidireccionales asociados a mioclonias—, ataxia cerebelosa estática con vértigos y disartria; neuroblastoma infantil y cáncer bronquial o mamario (Dropcho, 2005).

El síndrome miasténico de Lambert-Eaton se describió como una alteración de la unión neuromuscular asociada a cáncer bronquial en 1953 por Anderson, pero no fue hasta 1957 cuando Lambert-Eaton lo estableció como un síndrome, clínicamente y electrofisiológicamente diferente a miastenia gravis (Lambert E, 1957). Esta enfermedad se caracteriza por un cuadro de debilidad progresiva con afección predominante de la musculatura proximal, los reflejos están disminuidos o ausentes y es común la presencia de disfunción autonómica, boca seca, hipotensión postural, impotencia, debilidad de los músculos de la respiración y, en estadios avanzados, involucro craneobulbar con datos de ptosis, diplopía y disfagia (Mason y col., 1997). El 60% de los pacientes con el síndrome de Lambert-Eaton presentan cáncer de células pequeñas del pulmón y a veces cáncer renal y linfomas (Chalk y col., 1990). Para este síndrome se ha demostrado de manera más clara una causa autoinmunitaria, no sólo porque puede haber alteraciones tiroideas, anemia perniciosa, vitíligo, psoriasis y

diabetes tipo 1, sino porque la relación anticuerpos anti-VGCC y CCPP es muy específica (Dropcho 1995, Moli 1995, Rudnicki 2000). Los anticuerpos anti-canales de calcio, impiden la entrada del mismo en respuesta a los potenciales de acción, lo cual disminuye la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular y provoca alteración en la conducción del estímulo nervioso, que por electrodiagnóstico se manifiesta como un incremento en la amplitud del potencial de acción, lo que ayuda a establecer el diagnóstico diferencial con miastenia gravis. En estos pacientes, el tratamiento antineoplásico es efectivo, así como el uso de piridostigmina y plasmaferesis (Lambert, 1957).

Otros síndromes paraneoplásicos son: el del hombre rígido, la mielopatía necrotizante paraneoplásica, la neuropatía sensitiva paraneoplásica, las vasculitis de nervio y músculo con polineuropatía de nervio y músculo, neuropatías periféricas subagudas y crónicas paraneoplásicas, las dermatomiositis y las polimiositis (Rudnicki y Dalmau, 2000).

El síndrome del hombre rígido, descrito por Brown y Folli, se caracteriza por una rigidez fluctuante de la musculatura axial con espasmos superpuestos que afectan tronco inferior, piernas y en ocasiones brazos y cuello, que se desencadenan por trastornos emocionales y estímulos auditivos o somestésicos, los estudios electrofisiológicos demuestran actividad continua de unidades motoras de los músculos rígidos que mejora después del tratamiento con diazepam, la rigidez desaparece durante el sueño y con anestesia local o general, éste síndrome se asocia a cáncer de mama, pulmón y enfermedad de Hodgkin, también está asociado a fenómenos no paraneoplásicos como diabetes mellitus y poliendocrinopatía y con frecuencia anticuerpos anti-GAD (Folli y col., 1993).

La mielopatía necrotizante paraneoplásica es un trastorno raro agudo o subagudo que afecta primero a la médula torácica y luego asciende o desciende progresivamente por la médula hasta afectar al tronco encefálico, los pacientes presentan dolor lumbar o irradiado hacia las piernas, disfunción de esfínteres, déficit sensitivo de un segmento y paraplejía espástica o flácida que evoluciona a tetraplejía hasta llegar a la insuficiencia respiratoria y la muerte. El líquido cefalorraquídeo de estos pacientes presenta hiperproteinorraquia y pleocitosis leve. Se asocia a varios carcinomas o linfomas (Levin y col., 1998).

La neuropatía sensitiva paraneoplásica se caracteriza por una pérdida sensitiva progresiva que afecta extremidades, tronco y cara y pérdida auditiva neurosensorial. En los sujetos con esta alteración hay disestesias dolorosas comunes, con síntomas asimétricos, afectándose al final todas las formas de sensibilidad. Además, hay ataxia y movimientos pseudoatetósicos, hay signos de neuropatía axonal y desmielinizante por electrofisiología. Este síndrome se asocia a cáncer de células pequeñas de pulmón en el 70% de los casos, los anticuerpos detectados son anti-Hu, raramente anticuerpos anti-anfifisina y anti-CV2/CRMP5 (Antoine y Honnorat, 2000).

La vasculitis de nervio y músculo se produce en hombres de edad avanzada. Se caracteriza por polineuropatía sensitivo motora dolorosa simétrica o asimétrica subaguda o presente como una mononeuropatía múltiple, demostrándose degeneración axonal con afección nerviosa sensitivo motora; hay infiltrados inflamatorios intramurales y perivasculares de células T en la biopsia de músculo. Este síndrome se asocia a cáncer de células pequeñas de pulmón y linfomas, así como la presencia de anticuerpos anti-Hu. El tratamiento es con esteroides o inmunosupresores (Oh, 1997).

Las neuropatías periféricas subagudas y crónicas paraneoplásicas se asocian a cáncer de pulmón y mama y en ellas suelen encontrarse anticuerpos antineuronales anti-Hu, anti-CV2/CRMP5 (Antoine y col., 1999),

Otras neuropatías son las asociadas a discrasias de células plasmáticas y linfoma de células B, mieloma múltiple, mieloma osteoesclerótico o macroglobulinemia de Waldenström (Bernal y col., 2003).

La miopatía necrotizante subaguda se caracteriza por el inicio agudo de debilidad muscular proximal dolorosa de rápida generalización y afectación de los músculos respiratorios y faríngeos, con elevación de enzimas creatina cinasa sérica, con hallazgos miopáticos por electrofisiología, se asocia a varios tumores sólidos como carcinoma de pulmón, vejiga, mama y tubo digestivo (Bataller y Dalmau, 2004).

Hay dermatomiositis y polimiositis que se asocian con neoplasias malignas de mama, pulmón, ovario y gástrico y con menor frecuencia tumores de páncreas, timo, de células germinales, melanoma, nasofaríngeo y linfoma. Clínicamente se caracterizan por inicio subagudo de debilidad muscular proximal afectando músculos flexores del cuello, faríngeos y respiratorios. Histopatológicamente, hay infiltración de linfocitos CD4 en las dermatomiositis y de células CD8 en polimiositis, necrosis muscular. En el 50% de los pacientes hay anticuerpos dirigidos contra histidil-tRNA sintetasa (anti-Jo-1) (Amato y Barohn, 1997). También hay síntomas visuales paraneoplásicos, que pueden afectar la retina, úvea y nervios ópticos. Los síntomas de retinopatía paraneoplásica son fotosensibilidad, pérdida de visión progresiva y de la percepción de colores, escotomas centrales o en anillo y ceguera nocturna, la retinopatía asociada a melanoma afecta a pacientes con melanoma cutáneo metastásico, siendo la ceguera nocturna la principal manifestación clínica. También hay fotopsias brillantes, parpadeantes o pulsátiles, que progresan a pérdida visual total. La neuritis óptica paraneoplásica es rara y cursa con

pérdida visual indolora progresiva y papiledema. Se desarrolla de forma aislada y se asocia a encefalomiелitis paraneoplásica. Esta alteración se asocia a la presencia de anticuerpos anti-retinianos tales como la proteína 1 tipo tubby, el receptor nuclear específico de los fotorreceptores, anticuerpos que reaccionan con las células bipolares de la retina y anticuerpos anti-CV2/CRMP5. (Jacobson, 1996) (Tabla 1).

Tabla 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SÍNDROMES NEUROLÓGICOS PARANEOPLÁSICOS

Síndrome paraneoplásico	Anticuerpo	Antígeno	Principal cáncer asociado	Función del antígeno neuronal	Características Clínicas
Encefalomiелitis, neuropatía sensitiva.	Anti-Hu (ANNA-1)	HUC, HuD, HuB1, HuR	Cáncer de células pequeñas de pulmón.	Proteínas ligadas al ARN, participan a la diferenciación y supervivencia neuronal (Núcleos neuronales)	Confusión, depresión, agitación, amnesia, agitación, demencia, crisis parciales complejas, oscilopos, diplopía, disartria, hipostenosis postural y síntomas de afectación del sistema nervioso autónomo. Polineuropatía sensitivo motora dolorosa simétrica e asimétrica subaguda, mononeuropatía múltiple
Degeneración cerebelar.	Anti Yo (PCA-1, APCA-1)	CDR14, CDR12-1, CDR12-2	Ginecológicos, mama.	CDR12 contiene leucine-zipper motif, lo que sugiere una función en la regulación de la expresión génica. (Citoplasma de células de Purkinje)	Ataxia troncal, apendicular, disartria, nistagmo vertical
Ataxia cerebelar, opsoclonia/mioclono	Anti Ri (ANNA-2)	Novo-1, Novo-2	Ginecológicos, mama, cáncer de células pequeñas de pulmón, neuroblastoma.	Proteínas ligadas al ARN. Participan en la regulación del splicing del ARN neuronal (Núcleos neuronales)	Secudías espontáneas, arrítmicas de la mirada, mioclonías de cabeza, tronco y extremidades, ataxia, hipostenosis e inestabilidad
Sx. Stiff-man, encefalomiелitis	Anti-amifina	Amifina I	Mama.	Función en la endocitosis de las vesículas sinápticas (Vesículas sinápticas)	Rígidez fluctuante de la musculatura axial y espasmos
Sx Eaton-Lambert	Anti CDVC*	CDVC*	Cáncer de células pequeñas de pulmón.	Influjo de calcio para liberación de vesículas de acetilcolina en la terminal sináptica. (Canales dependientes de voltaje de calcio presinápticos)	Debilidad muscular que aumenta con el ejercicio, mialgias, diplopía, disartria, ptosis.
Disfunción cerebral y cerebelar.	Anti Ma	Ma1 Ma2 Ma3	Varios	Fosfoproteínas, biogénesis de ARN (Núcleos y citoplasma neuronales)	Ataxia troncal, apendicular, disartria, nistagmo vertical
Degeneración de fotorreceptores	Anti-retina	Recoverin y otros (PRN, proteína tubby-like 1)	Cáncer células pequeñas de pulmón.	Fotorreducción de la señal luminosa en conos y bastones de la retina.	Fotoinsensibilidad, pérdida progresiva de la visión, pérdida de percepción de colores, escotomas, ceguera nocturna
Encefalitis límbica, disfunción cerebral	Anti Ta	Ma2	Testículo	(Núcleos y citoplasma neuronales)	Confusión, depresión, agitación, amnesia, agitación, demencia, crisis parciales complejas, oscilopos, diplopía, disartria, hipostenosis postural y síntomas de afectación del sistema nervioso autónomo
Neuromiotonía paraneoplásica	Anti-VGKC		Tumor y células pequeñas de pulmón	Núcleos neuronales	Debilidad muscular y miotonía progresiva.
Mielopatía necrotizante paraneoplásica	Inespecíficos		Linfomas, células pequeñas de pulmón, carcinomas vesicales, mama, próstata y ovario		Pérdida de la función motora y sensitiva rápidamente progresiva, de evolución ascendente y afectación de esferas, percepción táctil y dolor reducida.

*CDVC Canales de calcio dependientes de voltaje (Chávez 2000; Darnell 1996; y Batailler, 2002).

A. Síndromes neurológicos paraneoplásicos en México

En México no se llevan a cabo las técnicas de diagnóstico de SNP, que se emplean en forma rutinaria en el extranjero y no existen estudios de la incidencia de SNP, pero hay numerosos casos de pacientes con alteraciones neurológicas de etiología indeterminada que podrían corresponder a SNP. La revisión del periodo comprendido del 2000 al 2003, del registro de internamiento en el Instituto Nacional de Neurología revela que el diagnóstico de pacientes con síndromes neurológicos de causa desconocida, y probable origen paraneoplásico es rutinario (Tabla 2).

Tabla 2. Casos de pacientes con diagnóstico de síndromes neurológicos de causa desconocida y probable origen paraneoplásico de 2000-2003 en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Registro del Paciente	Fecha	Edad	Diagnóstico
77503	03-2000	72	Neuropatía + cerebelo
151590	10/2000	50	Neuropatía axonal motora
152566	01/2001	71	NMI
15726	09/2001	78	Síndrome cerebeloso
153061	01/2001	50	Polineuropatía desmielinizante
154631	04/2001	34	Linfoma vs ELA
155287	09/2001	73	MIG
155336	08/2001	42	Neuropatía axonal
156365	12/2001	51	Polineuropatía
156562	09/2001	35	Neuropatía+ Pb osteosarcoma
157168	12/2001	17	Neuropatía motora
157266	05/2001	54	Neuropatía
157844	12/2001	67	Miopatía
158132	01/2002	69	Opcoclonus-mioclonus
158461	01/2002	67	Neuropatía
158710	04/2002	57	Stiff-man
159263	10/2002	65	Mioclonias + cerebelo
159414	04/2002	36	Opcoclonus-mioclonus
160402	06/2002	67	Neuropatía + Pb Ca recto
160710	06/2002	59	Neuropatía
161754	10/2002	42	Dermatomiositis
162473	11/2002	65	Miopatía
162612	12/2002	72	Degeneración cerebelosa
163167	01/2003	67	Degeneración cerebelosa
163641	02/2003	65	Enfermedad no identificada

II. HIPÓTESIS

A. Alterna

Las alteraciones neurológicas en pacientes en los que no se encuentra una etiología infecciosa, vascular, traumática, metabólica o hereditaria, pueden relacionarse con la presencia de autoanticuerpos anti-neuronales.

B. Nula

Las alteraciones neurológicas en pacientes en los que no se encuentra una etiología infecciosa, vascular, traumática, metabólica o hereditaria no se relaciona con la presencia de autoanticuerpos anti-neuronales.

III. OBJETIVOS

A. Buscar la presencia de anticuerpos antineuronales en el suero de pacientes con alteraciones neurológicas que no puedan ser explicadas por una causa infecciosa, vascular, traumática, metabólica, por deficiencia nutricional o hereditaria, provenientes de los Institutos Nacionales de Neurología, Cancerología y de Enfermedades Respiratorias, que se presenten a Consulta en un periodo comprendido de marzo a diciembre 2007.

B. Correlacionar la presencia de los auto-anticuerpos anti-neuronales con los síntomas clínicos de los pacientes con sospecha de síndrome neurológico paraneoplásico.

IV. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que algunos pacientes con alteraciones neurológicas que no pueden ser explicadas por una causa infecciosa, vascular o traumática cursan con auto-anticuerpos dirigidos contra las neuronas y que éstos se asocian a la presencia de un tumor localizado fuera del sistema nervioso, el cual tiene antígenos similares a componentes neuronales y cuya presencia, en numerosas ocasiones puede orientar al clínico a la búsqueda de un tumor específico. Estas alteraciones se han designado dentro de un grupo de patologías denominado síndrome neurológico paraneoplásico (SNP). No obstante, en México no existen estudios de la incidencia de los SNP y la técnica de determinación de los auto-anticuerpos a los que asocian no se realiza rutinariamente. En este trabajo, queremos iniciar el estudio de la incidencia de los SNP en México, estandarizar el método de determinación de auto-anticuerpos anti-neuronales y evaluar si los pacientes con alteraciones neurológicas que no se sustentan en causas conocidas, se asocian a la presencia de tales anticuerpos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Población de estudio. Se incluyeron de manera consecutiva a todos los pacientes que fueron ingresados o vistos en la consulta externa de los Institutos Nacionales de Neurología y Neurocirugía, Cancerología y de Enfermedades Respiratorias, quienes presentaban manifestaciones compatibles con SNP y en quienes se les descartó otras entidades de origen metabólico, cerebrovascular, infeccioso, o nutricional. Se analizó la funcionalidad de los pacientes por medio de la Escala de Karnofsky (*Anexo 1*).

1. Criterios de Inclusión (*Tabla 3*).

Tabla 3. Criterios de inclusión

Historia clínica completa
Examen clínico neurológico completo
Estudios generales de laboratorio: BH, electrolitos séricos, pruebas de función renal y hepática, niveles séricos de calcio y fósforo y perfil hormonal completo.
Consentimiento informado (Anexo 2)
Estudio citoquímico y citológico del LCR.
Estudio electrofisiológico con EMG, VCN y en los casos necesarios potenciales evocados.
Estudios de imagen cerebral y toraco-abdominal
Perfil inmunológico completo
En los casos en los que se hayan demostrado la presencia de neoplasias (sin importar su localización) se incluirán el resultado histopatológico obtenido por biopsia o exéresis de la neoplasia.
Protocolo extenso de búsqueda de neoplasia probable, que incluya: estudios de imagen, estudios endoscópicos y marcadores neoplásicos

2. Criterios de exclusión (Tabla 4)

Tabla 4. Criterios de exclusión

Los que no desearan participar en el estudio Los pacientes con expedientes incompletos Los pacientes sin resultados completos Los pacientes sometidos a protocolo diagnóstico incompleto y aquellos con demostración de metástasis en SNC.

B. Diseño del estudio: Descriptivo, observacional, transversal.

C. Toma de sangre

Se tomaron 5 ml de sangre venosa en tubos sin anticoagulante. El suero se colocó en tubos de Eppendorf y se congeló a -20°C, hasta su uso para la determinación de auto-anticuerpos anti-neuronales.

D. Obtención de cerebelos de ratas para determinación de auto-anticuerpos anti-neuronales (Anexo 3).

1. Perfusión de animales.

2.- Procesamiento de tejido para congelación.

Se procesa el cerebelo de la rata en congelación con técnica específica

3.- Obtención de cortes de cerebelo de rata.

E. Determinación de autoanticuerpos anti-neuronales

Se realizó el método de inmunohistoquímica según el Consenso Internacional de NeuroInmunología 1994 para la detección de autoanticuerpos antineuronales. (Moll y col., 1995). Se utilizaron cortes de cerebelos de ratas fijados con PFA al 2% y se incubaron con el suero de los pacientes. El suero probado sobre cerebelo fue, preincubado sobre hígado y riñón de rata para eliminar la tinción de neuronas por autoanticuerpos órgano-inespecíficos. La revelación de la presencia de anticuerpos antineuronales se hizo mediante la utilización de anticuerpos secundarios anti-humano, acoplados a peroxidasa, que será revelado con un substrato colorido específico. Los controles del ensayo serán sueros positivos confirmados de pacientes con anticuerpos anti-neuronales anti-Hu, anti-Ri, anti-Yo, anti-GAD, anti-Tr y anti-CV2 (controles positivos) y dos sueros de pacientes sin anticuerpos anti-neuronales (controles negativos), provenientes del control de Referencia para diagnóstico de SNP del INSERM U495 de Paris (**Anexo 4**).

E. Análisis de resultados

Se analizaron los datos demográficos de los pacientes, se determinó la incidencia de casos positivos a autoanticuerpos anti-neuronales en la muestra y se correlacionó su presencia con los síndromes presentados por cada paciente.

VI. RESULTADOS

A. Características de la muestra

Se reclutaron 27 pacientes con sospecha de síndrome neurológicos paraneoplásicos, de los cuales 15 (55.5%) fueron hombres y 12 (44.4%) fueron mujeres, con una edad promedio de 52 años. Todos los pacientes tuvieron una funcionalidad de 50 puntos de acuerdo a la escala de Karnofsky. Quince de 27 pacientes (56 %) tenían un tumor (Tabla 5), y en ellos (el tiempo promedio transcurrido desde el inicio de los síntomas neurológicos y el diagnóstico del tumor fue de dos años.

Los pacientes incluidos en el estudio tuvieron:

- 1) debilidad y parestesias en extremidades superiores e inferiores y tronco, disminución de los reflejos de estiramiento muscular e incapacidad para la deambulaci3n, siendo todas 3stas diagn3sticas de un cuadro de neuropatía; en el 40% de los pacientes el curso de la neuropatía fue subagudo (de 4 a 8 semanas) y en el 60% de ellas fue progresivo cr3nico. El 44.4% de los pacientes tuvo hipoestesia propioceptiva. La afecci3n neuropática fue predominantemente asimétrica en el 65% de los pacientes, simétrica en el 25% y mononeuropática en el 10%. No hubo sntomas disauton3micos.
- 2) disartria, ataxia, alteraci3n en la coordinaci3n (dismetría, disdiadococinesia), nistagmus y vértigo, sntomas característicos de degeneraci3n cerebelosa (29 %);
- 3) alteraciones en el sensorio y alteraciones mentales (ansiedad, depresi3n, agitaci3n, alucinaciones, confusi3n y amnesias), característicos de encefalitis límbica (11.1 %).
- 4) oscilopsias, inestabilidad ocular con movimiento oculares sacádicos y mioclonías multifocales, sntomas característicos de opsoclonus mioclonus (3.7%);
- 5) rigidez muscular de la musculatura paraespinal y abdominal conducentes a posturas anormales que se desencadenaban por movimientos voluntarios, emociones o estímulos auditivos o somestésicos, sntomas característicos del Síndrome del Hombre Rígido (3.7 %).
- 6) alteraciones mentales, acompañadas de crisis convulsivas, cuadriparesia y alteraciones del tronco cerebral (diplopía, disfagia, trastornos de la mirada conjugada), característicos de encefalomielitis (3.7%).
- 7) paraparesia con datos de afecci3n piramidal y nivel sensitivo de alteraci3n a nivel medular, sntomas característicos de mielopatía necrotizante (3.7%).

Algunos de los pacientes incluidos tenían cáncer (Tabla 5).

B. Resultado de la determinación de auto-anticuerpos anti-neuronales

La determinación de autoanticuerpos antineuronales por el método de inmunohistoquímica evidenció 15 pacientes positivos a diversos anticuerpos (55 %) y 12 pacientes negativos (44 %).

Seis de los 12 pacientes con polineuropatía fueron positivos para auto-anticuerpos anti-Hu (Fig. 1). hallazgo que se correlaciona con lo descrito en la literatura médica, en donde se reporta que la especificidad de la detección de anti-Hu en neuropatía paraneoplásica es del 99.8% con una sensibilidad del 82% (Molineuro, Graus y Guerrero 1998).

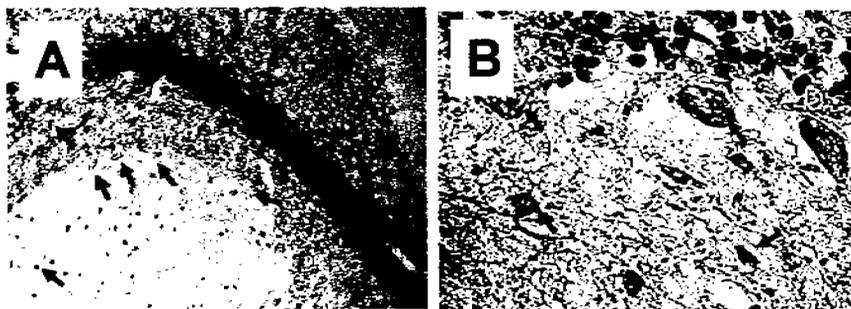


Fig. 1. Perfil inmunohistoquímico revelado por autoanticuerpos anti-Hu, presentes en pacientes con polineuropatía paraneoplásica. Este marcaje se caracteriza por tinción de toda la neurona predominantemente por su núcleo, tanto de neuronas de Purkinje como células de la capa molecular. A, 10X; B, 100X

Es importante mencionar, que al igual que en lo reportado en la literatura médica, (Chalk y col., 1992), los pacientes en este estudio quienes cursaban con síntomas de neuropatía probablemente paraneoplásica presentaban un patrón polineuropático mixto axonal y desmielinizante en un 50% de los casos, seguido de polineuropatía axonal (41.6%) y un solo caso de polineuropatía sensitiva pura (8.4%).

Cinco de los pacientes, con cuadro de neuropatía de etiología incierta, tuvieron un cáncer asociado, pero sólo dos de ellos presentaron positividad para anti-Hu y anti-Ri, éste último autoanticuerpo, es detectado comúnmente en mujeres postmenopáusicas y quienes presentan signos de afección del tallo cerebral, mesencéfalo, cerebelar, medulares y descrito con mayor frecuencia en pacientes con Síndrome opsoclonus-mioclonus, siendo los carcinomas de pulmón o ginecológicos frecuentemente asociados con dicho autoanticuerpo; sin embargo en este estudio, la presencia del anti-Ri (Fig. 2) se explica debido a que el marcaje inmunohistoquímico es muy similar al anti-Hu (tiñe tanto núcleo como el citoplasma de las neuronas) con la excepción de que el anti-Ri no tiñe a nivel del sistema nervioso periférico, ello no descarta de que el paciente pueda tener más autoanticuerpos antineuronales no detectados en este ensayo que estén en directa con el tumor laríngeo y sea el causante de la neuropatía. Para confirmar que efectivamente se este generando una repuesta autoinmunitaria se debe de corroborar que hay autoanticuerpos en contra del tumor por medio de la realización de búsqueda de dichos anticuerpos directamente en el tumor.

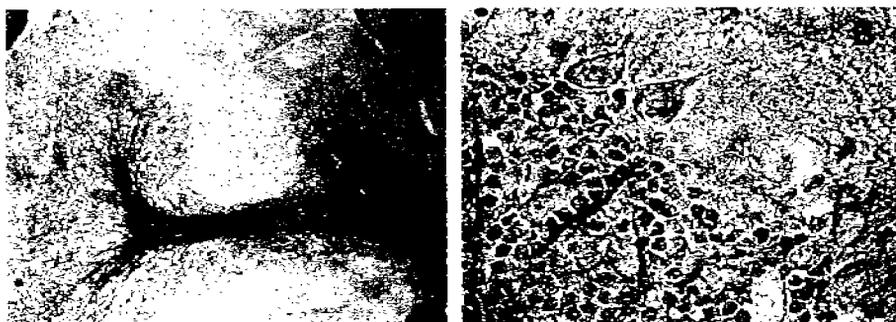


Fig. 2. Perfil inmunohistoquímico revelado por autoanticuerpos anti-Ri, presentes frecuentemente en pacientes con opsoclonus-mioclonus; sin embargo en este estudio fue encontrado en un paciente con polineuropatía. Este marcaje se caracteriza por tinción granular de citoplasma con apariencia de un núcleo vacío, de las células de Purkinje y las neuronas de la capa molecular. A, 10X; B, 100X

Cuatro de los ocho pacientes con degeneración cerebelosa tuvieron anticuerpos antineuronales positivos. Tres de ellos (75 %), fueron anti-Yo (Fig. 3) y uno de ellos fue antiHu.

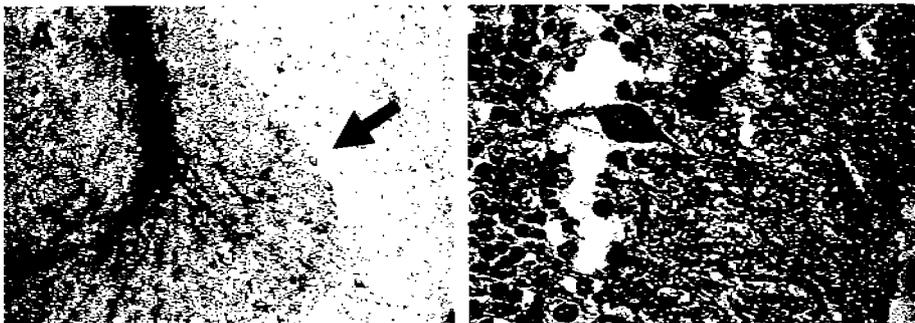


Fig.3. Perfil inmunohistoquímico revelado por autoanticuerpos anti-Yo, presentes en pacientes con degeneración cerebelosa. Este marcaje se caracteriza por tinción granular de citoplasma con apariencia de un núcleo vacío, de las células de Purkinje y las neuronas de la capa molecular. A, 10X;B, 100X

Los síntomas más frecuentemente encontrados en estos pacientes fueron la ataxia y disartria 62.5%, seguido de dísimetría y disdiadococinesia en el 25% y el 12.5% tenía predominio de nistagmo central. El promedio del tiempo de inicio de los síntomas de DCP hasta que se determinó el anticuerpo antineuronal fue entre los 13 meses y 23 meses.

De los tres pacientes con positividad para autoanticuerpos anti-Yo dos tenían adenocarcinoma de ovario y uno gástrico, y el positivo para anti-Hu asociado a cáncer de células pequeñas de pulmón, muy similar a lo descrito en la literatura, así como también la asociación de polineuropatía a DCP como un síndrome de superposición paraneoplásica.

Hubo cuatro pacientes con síntomas cerebelosos con negatividad para autoanticuerpos, esto se puede presentar hasta en un 50%, cuando se asocian a cáncer de células pequeñas de pulmón. (Molinuelo y col., 1998).

Dos de los tres pacientes con encefalitis límbica (66%) tuvieron autoanticuerpos anti-Hu, autoanticuerpo antineuronal que hasta en el 75% se presenta con frecuencia en pacientes con CPCP, por lo que éstos pacientes con positividad para anti-Hu y cuadro clínico compatible con encefalitis límbica deben ser rastreados con broncoscopia para detectar de forma temprana el tumor.

En el análisis también observamos la presencia de neuropatía mixta subaguda en un paciente con cuadro característico de EL y con autoanticuerpo anti-Hu, ésta asociación ha sido descrita por la afectación de los ganglios dorsales el llamado "síndrome anti-Hu" (Dalmau col., 1992).

Un paciente con cáncer embrionario testicular y cuadro característico de encefalitis límbica no se determino autoanticuerpo antineuronal (**Fig. 4**).

Sólo un paciente presentó opsoclonus mioclonus y fue positivo al autoanticuerpo antiYo.

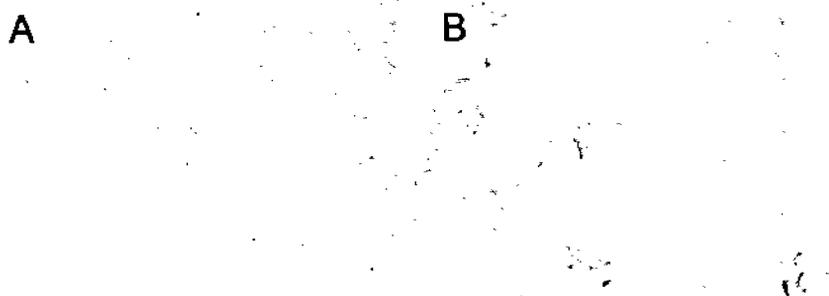


Fig. 4. Perfil inmunohistoquímico negativo para autoanticuerpos antineuronales. En paciente con cuadro clínico de encefalitis límbica. En este marcaje no se observa tinción en el citoplasma de las células de las capas de cerebelo ni en las neuronas de Purkinje. **A**, 63X; **B**, 100X.

Hubo una paciente con cuadro clínico sugerente de síndrome del Hombre Rígido, el cual fue positivo al autoanticuerpo anti-GAD (Fig. 5) quien tenía sintomatología de predominio en miembros inferiores con un promedio de tiempo de evolución de 2 años desde el inicio de los síntomas; y a quien no se le asocio enfermedad neoplásica, pero en aquellos pacientes que se sospecha secundario a paraneoplásico se reporta con gran frecuencia la presencia de autoanticuerpos anti-fisifisina. En los pacientes que no tienen asociación del SHR con cáncer, el autoantígeno más importante es al anti-GAD, desarrollando hasta en un 70% de los casos diabetes Mellitas tipo I y otras enfermedades autoinmunes; éstas se relacionan con tres antígenos como son GAD, anfifisina y gefrina. (Dalakas, 1999).

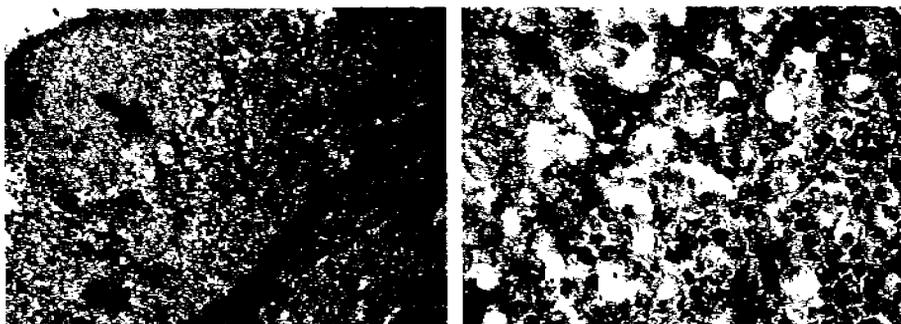


Fig. 5. Perfil inmunohistoquímico revelado por autoanticuerpos anti-GAD, presentes en un paciente con Síndrome Del Hombre Rígido. Este marcaje se caracteriza por tinción de terminales nerviosas alrededor de los cuerpos de las neuronas de Purkinje en el cerebelo de rata. A, 10X; B, 100X

La paciente con cuadro clínico subagudo de disartria, vértigo, oscilopsias, diplopía trastorno de la mirada conjugada, paraparesia, y síntomas disautonómicos sugerente de encefalomiелitis se detecto negativa para autoanticuerpos antineuronales, a pesar de ser portadora de un

adenocarcinoma de pulmón. Este dato debemos de tomarlo en cuenta ya que con menor frecuencia son encontrados otros autoanticuerpos antineuronales como son anti-CV2, antififisina, anti-Ma y anti-PCA2, aunque en asociación con anti-Hu (Voltz y col., 1999).

Igualmente, otro paciente con diagnóstico de adenocarcinoma de mama, cuyos síntomas predominaba paraparesia de miembros inferiores, sugerente de mielopatía necrotizante y otra paciente con opsoclonus mioclonus quien también se obtuvo autoanticuerpo anti-Yo, autoanticuerpo no frecuente en esta entidad neurológica.

VII. Discusión

Este reporte constituye la primera evidencia en la literatura médica en México de la presencia de los autoanticuerpos anti-neuronales en los pacientes mexicanos quienes presentan clínicamente un cuadro de SN sin etiología definida.

Diferentes técnicas de inmunohistoquímica han sido utilizadas para la determinación de autoanticuerpos anti-neuronales en los SNP, sin embargo, internacionalmente se ha demostrado que la mejor es la técnica de inmunohistoquímica peroxidasa avidina-biotina la cual fue utilizada en nuestra metodología, debido a su alta confiabilidad en la detección de los autoanticuerpos incluyendo los menos comunes como Anti-GAD.

La mitad de los pacientes con síndromes neurológicos sin causa definida presentaron positividad para algún autoanticuerpo.

La polineuropatía paraneoplásica representó la mayoría de SNP encontrando anti-Hu como marcador antineuronal característico, y asociado a

carcinoma de mama en un paciente y en otro a carcinoma laríngeo con positividad para anti-Ri, dato importante ya que no hay caso reportado con esta asociación en la literatura médica.

La superposición de distintos SNP es frecuente. En este estudio el 37% de los pacientes con cuadro de DC tuvo un patrón de polineuropatía.

Se corrobora que el cáncer más asociado a la presencia de anticuerpos anti-Hu es el carcinoma de células pequeñas de pulmón.

En el grupo de pacientes con encefalitis límbica paraneoplásica dos de ellos dieron positividad para anti-Hu, a diferencia del hecho conocido en la literatura de su asociación a anti-Ma y anti-Ta (Dalmau y col., 1990).

VIII. CONCLUSIONES

A pesar de la baja incidencia reportada en la literatura de los SNP, en este estudio demostramos que en el lapso de un año se pudieron encontrar pacientes con síndromes neurológicos de etiología no definida que correspondieron a SNP que se correlacionaron con la presencia de autoanticuerpos antineuronales similares a los que se han visto en la literatura. Será de gran interés analizar si los anticuerpos anti-Yo del paciente con cáncer laríngeo reconocen antígenos del tumor, hallazgo que no ha sido aun reportado en la literatura.

Los SPN aparecen bien caracterizados en su presentación clínica, sin embargo tienen una gran complejidad diagnóstica, esta complejidad deriva de la heterogeneidad clínico-inmunológica, dando así distintos patrones de autoanticuerpos a un mismo síndrome o al contrario, por lo que es difícil definir categóricamente el diagnóstico a pesar de la detección de los autoanticuerpos

antineuronales, es por ello que representan un gran reto diagnóstico para el neurólogo clínico.

El problema diagnóstico se incrementa cuando no disponemos de apoyo serológico, como en nuestro país, complicando así la atención oportuna de los pacientes con un cáncer oculto y potencialmente tratable.

Este estudio servirá para continuar el estudio de los SNP en México, relacionados con su epidemiología y fisiopatología.

Los síndromes neurológicos paraneoplásicos deben tenerse en consideración ya que en la mayoría de los casos preceden a las manifestaciones clínicas de la neoplasia que los produce y pueden permitir su diagnóstico en una fase precoz.

REFERENCIAS

- Amato AA, Barohn RJ.** Idiopathic inflammatory myopathies. *Neurol Clin.* 1997; 15(3):615-648.
- Anderson HJ, Churchill-Davidson HC, Richardson AT.** Bronchial neoplasm with myasthenia. *Lancet.* 1953 19;265:1291-293.
- Antoine JC, Mosnier JF, Absi L, Convers P, Honnorat J, Michel D.** Carcinoma associated paraneoplastic peripheral neuropathies in patients with and without anti-onconeural antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999;67(1):7-14.
- Antoine JC, Absi L, Honnorat J, Boulesteix JM, de Brouker T, Vial C, Butler M, De Camilli P, Michel D.** Anti-amphiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic neurological syndromes and tumors. *Arch Neurol.* 1999;56(2):172-177.
- Antoine JC, Honnorat J.** Anti-neuronal antibodies and central nervous system diseases: contribution to diagnosis and pathophysiology] *Rev Neurol (Paris).* 2000;156 (1):23-33.
- Antoine JC, Camdessanche JP, Absi L, Devic disease and thymoma with anti-central nervous system and antithymus antibodies.** *Neurology* 2004; 62:978-980.
- Ashour AA, Verschraegen CF, Kudelka AP, Kavanagh JJ.** Paraneoplastic syndromes of gynecologic neoplasms. *J Clin Oncol.* 1997;15(3):1272-1282.
- Bataller L, Rosenfeld MR, Graus F, Vilchez JJ, Cheung NK, Dalmau J..** Autoantigen diversity in the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Ann Neurol* 2003; 53:347-353.
- Bataller L, Dalmau JO.** Paraneoplastic disorders of the central nervous system: update on diagnostic criteria and treatment. *Semin Neurol.* 2004;24(4):461-471.
- Boscolo S, Passoni M, Baldas V, Cancelli I, Hadjivassiliou M, Ventura A, Tongiorgi E.** Detection of anti-brain serum antibodies using a semi-quantitative immunohistological method. *J Immunol Methods.* 2006 20;309(1-2):139-149.
- Camdessanche JP, Lassabliere F, Meyronnet D, Ferraud K, Absi L, Honnorat J, Antoine JC.** Expression of the onconeural CV2/CRMP5 antigen in thymus and thymoma. *J Neuroimmunol.* 2006;174(1-2):168-173.
- Bernal F, Shams'ith S, Rojas I, Sanchez-Valle R, Saiz A, Dalmau J, Honnorat J, Silveis Smitt P, Graus F.** Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology.* 2003;60(2):230-234.

Brown P y Marsden CD. The stiff man and stiff man plus syndromes. *J Neurol.* 1999;246(8):648-652.

Chalk CH, Windenbank AL, Kimmel DW, McManis PG. The distinctive clinical features of paraneoplastic sensory neuronopathy. *Can J Neurol Sci* 1992;19:346-51.

Chalk CH, Murray NM, Newsom-Davis J, O'Neill JH, Spiro SG. Response of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome to treatment of associated small-cell lung carcinoma. *Neurology.* 1990;40(10):1552-1556.

Chávez Mac Gregor Mariana, Ochoa Carrillo Francisco Javier, Fuentes Albuero Adolfo. Síndromes paraneoplásicos neurológicos. *Rev Inst Nat Cancerol Méx* 2000; 46(4) : 281-289.

Cunningham J, Graus F, Anderson N, Posner JB. Partial characterization of the Purkinje cell antigens in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurology.* 1986 Sep;36(9):1163-1168.

Dalakas MC, Clinical symptomatology of stiff-person syndrome: an autoimmune disorder affecting neurotransmission of gamma-aminobutyric acid. *Ann Intern Med* 1999;131:522-30

Dalmau J, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol.* 1997;24(3):318-328.

Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine* 1992; 71:59-72.

Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small-cell lung cancer—a qualitative western blot analysis. *Ann Neurol* 1990;27:544-52.

Dolman J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *Am J Pathol.* 1992;141(4):881-886.

Darnell RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(10):4529-4536. Review

Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med.* 2003;349(16):1543-1554.

De Camilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Meinck HM, Austoni M, Fassetta G, Bottazzo G. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med.* 1993 Dec;178(6):2219-2223.

Drlicek M, Bianchi G, Bogliun G, Casati B, Grisold W, Kolig C, Liszka-Setinek U, Marzorati L, Wondrusch E, Cavaletti G. Antibodies of the anti-Yo and anti-Ri type in the absence of paraneoplastic neurological syndromes: a long-term survey of ovarian cancer patients. *J Neurol.* 1997;244(2):85-89.

Dropcho EJ. Autoimmune central nervous system paraneoplastic disorders: mechanisms, diagnosis, and therapeutic options. *Ann Neurol.* 1995;37 Suppl 1:S102-113.

Dropcho EJ. Update on paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Neurol.* 2005;18(3):331-336.

Folli F, Solimena M, Cofelli R, Austoni M, Tallini G, Fassetta G, Bates D, Cartledge N, Bottazzo GF, Piccolo G. Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. *N Engl J Med.* 1993 Feb25;328(8):546-551.

García R M, Gil García Rebeca, Xicotencatl Jiménez Villanueva. Síndromes Neurológicos paraneoplásicos Experiencia en el Hospital Juárez de México. *Revista del Hospital General Juárez de México.* Gamo 2006; 5(2):44- 46.

Giometto B, Taraloto B, Graus F. Autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes. *Brain Pathol.* 1999;9(2):261-273.

Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler Ch, Verschuur JJ, Vincent A, Voltz R. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75(8):1135-1140.

Honorat J, Antoine JC, Derrington E, Aguera M, Belin MF. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;61(3):270-278.

Jacobson DM. Paraneoplastic disorders of neuro-ophthalmologic interest. *Curr Opin Ophthalmol.* 1996;7(6):30-38.

Moll JW, Antoine JC, Brashear HR, Delattre J, Drlicek M, Dropcho EJ, Giometto B, Graus F, Greenlee J, Honnorat J. Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies: Report from the Workshop to the Fourth Meeting of the International Society of Neuro-Immunology on paraneoplastic neurological disease, held October 22-23, 1994, in Rotterdam, The Netherlands. *Neurology* 1995;45: 1937-1941.

Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH. The use of nitrogen mustards in the palliative treatment of cancer. *Cancer* 1948; 1: 634-656.

Lambert EH. Electromyography and electric stimulation of nerves in diseases of motor unit; observations on myasthenic syndrome associated with malignant tumors. *J Am Med Assoc.* 1957;163(13):1117-1124.

Lennon VA. The case for a descriptive generic nomenclature: clarification of immunostaining criteria for PCA-1, ANNA-1, and ANNA-2 autoantibodies. *Neurology* 1994; 44 (12):2412-2415.

Levin MI, Mozaffar T, Al-Lozi MT, Pestronk A. Paraneoplastic necrotizing myopathy: clinical and pathological features. *Neurology.* 1998;50(3):764-767.

Luque FA, Fumeaux HM, Ferziger R, Rosenblum MK, Wray SH, Schold SC Jr, Glantz MJ, Jaeckle KA, Biran H, Lesser M. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol.* 1991;29(3):241-251.

Mason WP, Graus F, Lang B, Honnorat J, Delattre JY, Valkdeoriola F, Antoine JC, Rosenblum MK, Rosenfeld MR, Newsom-Davis J, Posner JB, Dalmau J. Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain.* 1997;120:1279-1300.

Molinuevo JL, Graus F, Refie R, Guerrero A. Utility of anti-Hu antibodies in the diagnosis of paraneoplastic sensory neuropathy. *Ann Neurol* 1998;44:976-80.

Nano R, Balegno S, Vaccarone R, Corato M, Ceroni M. Detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies: comparison of different immunohistochemical techniques. *Anticancer Res.* 2003;23(3B):2377-2381.

Oh SJ. Paraneoplastic vasculitis of the peripheral nervous system. *Neurol Clin.* 1997;15(4):849-863.

Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology.* 1992;42(10):1931-1937.

Posner JB. Immunology of paraneoplastic syndromes: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;998:178-186.

Ropper AH, Gorson KC. Neuropathies associated with paraproteinemia. *N Engl J Med.* 1998;338(22):1601-1607.

Rosenfeld MR, Dalmau J. Current Therapies for Paraneoplastic Neurologic Syndromes. *Curr Treat Options Neurol.* 2003;5(1):69-77.

Rosenblum MK, Posner JB, Hammack J, Kotanides H. Paraneoplastic cerebellar degeneration. I and II Clinical and immunologic findings in 21 patients with Hodgkin's diseases. *Neurology* 1992;42 (10): 1938-1943.

Rudnicki SA, Dalmau J. Paraneoplastic syndromes of the spinal cord, nerve, and muscle. *Muscle Nerve.* 2000;23(12):1800-1818.

Sillevis Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Henzen-Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R. Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N Engl J Med.* 2000;342(1):21-27.

Stich O, Jarius S, Kleer B, Rasiach C, Voltz R, Raver S. Specific antibody index in cerebrospinal fluid from patients with central and peripheral paraneoplastic neurological syndromes. *J Neuroimmunol* 2007;183 (1-2): 220-224.

Vedeler CA, Antoine JC, Giometto B, Graus F, Grisold W, Hart IK, Honnorat J, Sillevis Smitt PA, Verschuuren JJ, Voltz R; Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork. Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol.* 2006;13(7):682-690.

Voltz R, Gultekin SH y Posner J. A serology marker of paraneoplastic limbic and brain stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Eng J Med* 1999;340:1788-1795.

Wilkinson PC, Zeromski J. Immunofluorescent detection of antibodies against neurons in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain* 1965;88:529-538.

ANEXOS

Anexo 1

ESCALA DE KARNOFSKY

Actividades	Puntuación	Equivalente físico
Normal, sin quejas, faltan indicios de enfermedad	100	Capaz de trabajo y actividad normales, sin necesidad de cuidados especiales
Llevar a cabo una actividad normal con signos o síntomas leves	90	
Actividad normal con esfuerzo. Algunos signos o síntomas morbosos	80	
Capaz de cuidarse, incapaz de actividad normal o trabajo activo	70	
Requiere atención ocasional, pero es capaz de satisfacer la mayoría de sus necesidades	60	No apto para el trabajo. Capaz de vivir en la casa, satisfacer la mayoría de sus necesidades. Necesita una ayuda de importancia variable
Necesita ayuda importante y asistencia médica frecuente	50	
Incapaz, necesita ayuda y asistencia especiales	40	Incapaz de satisfacer sus necesidades, necesita asistencia equivalente a la de un hospital. La enfermedad puede agravarse rápidamente
Totalmente incapaz, necesita hospitalización y tratamiento de soporte activo	30	
Gravemente enfermo. Tratamiento activo necesario	20	
Moribundo, irreversible	10	

Anexo 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: "Búsqueda de anticuerpos antineuronales en pacientes con síndromes neurológicos de etiología indeterminada".

Investigadores responsables: Dra. Mónica Saray Rodríguez Rodríguez y Dra. Ma. Lucinda Aguirre-Cruz. Subdirección de Investigación. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. México Distrito Federal.

Introducción

Lo invitamos a tomar parte en un estudio de investigación, dirigido a la búsqueda de anticuerpos anti-neuronales en pacientes en los que no se puede explicar la presencia de alteraciones nerviosas por causas infecciosas o traumáticas, o por la presencia de tumores en el sistema nervioso. Los resultados de este estudio facilitarán el establecimiento del diagnóstico en pacientes con alteraciones neurológicas que no pueden ser atribuidas a causas infecciosas, traumáticas o a la presencia de tumores cerebrales.

Hacemos de su conocimiento que:

1. Tomar parte de este estudio es totalmente voluntario.
2. Usted puede decidir no tomar parte, o abandonar el estudio en cualquier momento.
3. En cualquiera de los casos, usted no perderá ninguno de los beneficios como paciente de esta institución.
4. Este estudio podría darnos conocimiento valioso para ayudar a otros pacientes en el futuro.

Procedimiento y duración del mismo

Se trata de la toma de una muestra de su sangre para determinar si hay en ella anticuerpos dirigidos en contra de neuronas o de células cerebrales que pudieran estar causando sus síntomas neurológicos. Este estudio no interviene en su tratamiento y no le causará daño alguno. La toma de la muestra se realizará en menos de 5 minutos.

Riesgos y molestias

La toma de sangre provoca un ligero dolor, que pasa rápidamente, cuando se retira la jeringa con la que ésta se extrae.

Confidencialidad: su nombre y los nombres mencionados durante la entrevista con usted no serán presentados con los resultados de este estudio.

Acuerdo del participante: He leído y se me ha explicado la información escrita en los párrafos anteriores y estoy de acuerdo en participar en el estudio.

Mi firma al calce indica que acepto participar en este estudio.

Nombre: _____

Fecha: _____

Si usted tiene alguna pregunta sobre este proyecto, contáctenos por favor en el mail: monsarod25@yahoo.com.mx

Anexo 3

PERFUSION DE LA RATA

(Rata de 250g, con la que obtuve los cerebelos,
el tejido hepático y renal de 30 ratas)

a) Material

1. Bomba peristáltica a flujo bajo
2. Jeringa de 3ml
3. Gasas
4. Alcohol al 70%
5. Ketamina (1000mg/10ml) y Xilacina (20mg/ml)
6. Solución de lavado: PBS 1x (1000ml)

Sol. Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 1x para 1 litro.

<i>Soluto</i>	<i>Cantidad</i>
Cloruro de Sodio	6.5
Fosfato de Potasio Monobásico	2.8
Fosfato de Potasio Dibásico	0.4

7. Solución de fijado: PFA al 2% (1000ml)

Sol. Paraformaldehído (PFA) al 2%

1. Calentar 300ml de agua bidestilada a no más de 60° C.
2. Pesar 20g de PFA (Se encuentra en refrigeración).
3. Vertir los 20g de PFA en el agua bajo agitación.
4. Adicionar unas gotas de NaOH 10N/1N hasta la completa disolución del PFA.

5. Pesar reactivos para 1l de PBS 1x, disolverlos y aforar a 700ml con agua bidestilada.
6. Adicionar el PBS al PFA bajo agitación
7. Medir pH en potenciometro el cual no debe rebasar el valor de 9
8. Filtrarlo y ponerlo en hielo hasta que se use y durante su utilización.

8. Adicionar a la solución de lavado 1ml de Heparina por cada 500ml.

b) Parámetros de bomba peristáltica PERIMATIC GP

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Volumen	0.5ml
Count	999
Delay	0.5seg
Modo	Automatic
Profile	Show/Slow/Slow
Tube	5mm
Dirección	Run clockwise
Round	↓↓

c) Anestesia intraperitoneal

1. Cargar jeringa con Ketamina 1.5 ml (1000mg/10ml) y Xilacina 0.2ml (20mg/ml)
2. Tomar la rata por el dorso, con una sola mano, en un solo movimiento.
3. Con la rata correctamente inmovilizada (evitando cualquier movimiento durante el procedimiento) inclinarla caudalmente y trazar una línea imaginaria que cruce su abdomen transversalmente justo sobre sus rodillas. (Fig. 1A línea roja).
4. La aguja deberá ser insertada sobre esta línea, en el lado derecho del animal y lo más cercano posible a la línea que divide longitudinalmente

el abdomen (Fig. 1A línea azul). De esta manera disminuimos el riesgo de inyectar en ciego o vejiga urinaria.

5. La aguja debe alcanzar una profundidad de aproximadamente medio centímetro y debe insertarse con una inclinación de unos 30° con respecto a la superficie del abdomen.
6. Aspirar para asegurarse de que no se ha alcanzado ningún vaso sanguíneo, ciego o vejiga urinaria.
7. Si ningún fluido es aspirado, proceder a la inyección de la muestra.
8. Retirar la aguja y presionar ligeramente la zona de inyección.

d) Procedimiento

Con la rata ya anestesiada, colocarla en posición decúbito supino sobre una placa/rejilla adecuada para la recogida de los líquidos de lavado y fijación.

1. Lavar la superficie de la rata con etanol 70°.
2. Realizar un corte en la piel a la altura del final del esternón, separar la piel y cortar las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón.(Fig. 1B)
3. Insertar la aguja, bien de la jeringuilla o bien de la manguera (en caso de utilizar el aparato de perfusión) que contiene la solución de lavado, en el ventrículo izquierdo y profundizar en dirección a la aorta. (Fig. 1C)
4. La aguja puede fijarse con pinza Kelly durante la perfusión.
5. Realizar una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. (Fig. 1C)
6. Proceder al lavado con la solución salina o PBS 1x (1000ml)
7. Proceder a la perfusión de la solución de fijado (PFA 2% 1000ml).

8. Una vigorosa contracción muscular es indicativa de la correcta fijación del animal.
9. Al finalizar, retirar la aguja y proceder a la extracción de los órganos deseados.
10. Obtención de los órganos deseados.

PERFUSIÓN DE RATA

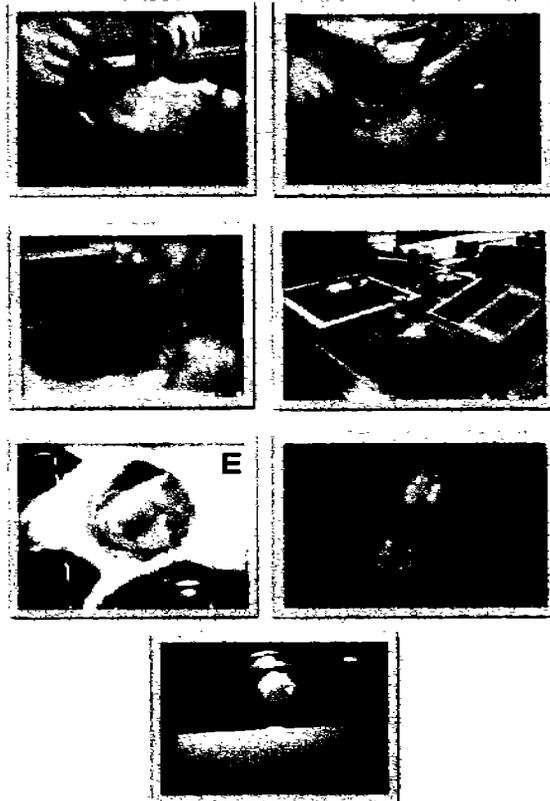


Fig 1. Perfusión de tejidos. A, anestesia intraperitoneal siguiendo líneas de orientación espacial; B, Insición de piel de tórax anterior para descubrir parrilla costal; C, Una vez retrinada la parrilla costal anterior se procede a colocar la aguja en el ventrículo izquierdo y a hacer una insición en la aurícula derecha que sirva de escape a la sangre y soluciones de perfusión; D, iniciar perfusión considerando los parámetros de la bomba peristáltica; E, rata en perfusión con solución reguladora de fosfatos, cabe hacer notar el cambio de coloración en los tejidos, con los pulmones congestionados y de color blanco, al igual que la pérdida de coloración del tejido hepático; F, Cerebelos obtenidos luego de la perfusión con PFA, e impregnados con sacarosa al 20%. G. Se monta el cerebelo de la rata y realizan cortes de 10 micras en el criostato.

Anexo 4

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS ANTI-NEURONALES

Sacar el número de laminillas necesarias del congelador a - 20 °C:

6 laminillas de testigos positivos

2 laminillas de testigos negativos

1 laminilla por paciente

Colocar las laminillas en las cámaras de incubación (las cuales deben tener papel filtro mojado en el fondo) con el tejido hacia arriba hasta que se sequen.

Identificar las laminillas con el lápiz diamante de acuerdo a números sucesivos de una tabla de identificación (tabla 3).

Dibujar un círculo alrededor del cerebelo con lápiz DAKO, teniendo cuidado de no apretar el lápiz sobre la laminilla.

Reunir las laminillas de espaldas en un porta-laminillas y sumergirlas en una cuba de vidrio que contenga PBS durante 5 minutos

1.- Inmersión en agua oxigenada.

Sumergir las laminillas durante 10 minutos en otra cuba de agua oxigenada al 1% (9 mL de agua oxigenada al 30%/250 ml de agua destilada).

Dos lavados de 5 min c/u con PBS pH 7.0 sin agitación (escurrir bien las laminillas antes de pasarlas de cuba a cuba).

2.- Incubación con amortiguador de bloqueo

Prever contar con regulador de bloqueo (RB) (PBS + 10 % de suero de cabra

suficiente para todas las laminillas, contar con 200 µl por cada una de ellas). Escurrir cada par de laminillas y secar con un pañuelo desechable la porción exterior del círculo sin tocar los cortes, ni la marca con el lápiz DAKO. Colocar las laminillas de nuevo en la cámara de incubación. (debe de haber el menor líquido posible alrededor de los cortes). Colocar el RB inmediatamente después de colocar las laminillas en la cámara, sin dejar que se seque el tejido . Incubar las laminillas con el RB durante 20 minutos a temperatura ambiente. Empezar a contar el tiempo cuando se haya terminado de adicionar el RB a todas las laminillas.

3.- Incubación de anticuerpo primario.

Preparar diluciones finales 1:500 de los sueros como sigue: 1). una dilución intermedia (1:50) en PBS pH 7.0 (4 µl de suero + 196 µl de PBS); 2). una dilución intermedia (1:10) en amortiguador de dilución (AD) (10 % de suero de cabra, 1 % de tritón al 10 %, PBS) (20 µl de la primera dilución + 180 µl del AD).

Eliminar el RB utilizando la bomba de vacío con un cono limpio en el extremo. Aspirar una columna entera (entre 6 y 8 laminillas de una sola vez), y después colocar los sueros con la micropipeta de 200 µl.

Poner agua destilada en el fondo de las cámaras para inmunohistoquímica.

Incubar 3 horas a 37°C dentro del horno.

Ecurrir las laminillas sobre papel absorbente y después sumergirlas de dorso, de dos en dos, en la cubas de vidrio que contienen PBS. Realizar dos lavados de 5 minutos cada uno sin agitación.

4.- Incubación con suero de pacientes que contienen los anticuerpos primarios

Ecurrir las laminillas sobre papel absorbente, secarlas alrededor del círculo del lápiz DAKO y volverlas a colocar en las cámaras de incubación para inmunohistoquímica.

Preparar una dilución 1:100 del anticuerpo secundario en AD (1 μ l de anticuerpo secundario + 199 μ l de AD), colocar 200 μ l del anticuerpo diluido en cada corte e incubar 30 minutos a temperatura ambiente (prever 200 μ l por corte).

5.- Incubación con anticuerpo secundario

Preparar en este momento el KIT ABC, el cual debe reposar 30 minutos en el refrigerador, en oscuridad antes de utilizarse. Prever 200 μ l por corte (1 gota de reactivo A + 1 gota de reactivo B para cada 5 ml de PBS), agitar en vórtex para agitar los dos reactivos. Envolver el tubo en papel aluminio y guardarlo en el refrigerador.

Ecurrir las laminillas sobre papel absorbente. Lavarlas dos veces en PBS durante 5 minutos en las cubas de vidrio sin agitación.

Ecurrirlas laminillas, secarlas, colocarlas de nuevo en las cámaras de incubación.

6.- Incubación con sistema de amplificador que se une al anticuerpo secundario y contiene Avidina-Biotina y peroxidasa.

Colocar la solución ABC (200 μ l por corte) teniendo cuidado de que no se sequen los tejidos.

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Ecurrir las laminillas sobre papel absorbente, lavar las laminillas dos veces con PBS durante cinco minutos en las cubas de vidrio sin agitación.

7.- Colocar el vector, la sustancia de peróxido + colorante (VIP)

Preparación del VIP: 3 gotas de cada solución por cada 5 ml de PBS, prever 200 μ l por corte, agitar después de la adición de cada reactivo.

Ecurrir las laminillas, secarlas, y volverlas a colocar en las cámaras de incubación.

Colocar el VIP en las laminillas testigo (200 μ l por cada corte), medir el tiempo necesario para que estos se coloren. Ecurrir las laminillas y colocarlas en una cuba con agua.

Revelar el resto de los cortes, de 3 en 3, del mismo modo como se hizo con los testigos.

Sumergir los cortes en el PBS.

Poner las laminillas en la campana de extracción y realizar los siguientes baños: dos en alcohol al 80%, dos en alcohol al 95%, dos en alcohol absoluto, uno en alcohol-xilol y terminar con tres baños de xilol, escurriendo las laminillas entre cada baño.

Sacar las laminillas una a una y ponerles una gota de resina para montar inmediatamente el cubreobjetos. Dejarlas secar en la campana de extracción y revisar en el microscopio laminilla por laminilla el patrón inmunohistoquímica correspondiente a cada paciente.