



- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 - FACULTAD DE MEDICINA
 - DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
 - INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “DR. IGNACIO CHÁVEZ”
-
- “GRADO DE CONCORDANCIA ENTRE EL PATRÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES Y LOS ANTICUERPOS ANTI-RNP, Sm, Ro/SSA, La/SSB Y ANTI-DNA DE DOBLE CADENA”
 - TESIS
 -
 - QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
 - ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA
-
- PRESENTA:
-
- DRA. ANGÉLICA IRENE MANDUJANO SANCHÉZ
-
- ASESOR:
 - DR. LUIS MANUEL AMEZCUA GUERRA
-
- MÉXICO, D.F. AGOSTO 2010



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.

I. FIRMAS

Dr. Luis Manuel Amezcua Guerra

Asesor de tesis

**Médico adscrito del departamento de Inmunología
Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”**

Dr. Manuel Martínez-Lavín García-Lascuráin

Profesor titular del curso

**Jefe del departamento de Reumatología
Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”**

Dr. José Fernando Guadalajara Boo

Director de Enseñanza

Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

II. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi asesor Luis Amezcua, te la debo aunque lo niegues. Tu espíritu científico, tu capacidad resolutive, tu confianza.

Al Dr. Rafael Bojalil y a la Dra. Rashidi, gracias por su apoyo total e incondicional. Todo me lo hicieron fácil.

Al Servicio y Laboratorio de Inmunología. Gracias por su apoyo y por su trabajo de todos estos años.

Al Servicio de Reumatología en general adscritos y residentes. Dr. Manuel Martínez-Lavín un verdadero ejemplo a seguir. Dr. Luis Silveira mi maestro en todos los días de la residencia. Gracias.

A Paty, muchas gracias por su apoyo, su simpatía, su compromiso.

Al personal de archivo, gracias por su apoyo y paciencia después de sacar, guardar y sacar y guardar más de 800 expedientes....

A mi familia que me heredó el amor a la ciencia, a la medicina, a los pacientes.

A mis favoritos: Meme, Vali, Camilin.... luciérnagas en la oscuridad.

A mis pacientes, la escuela de mi vida.

Al instituto por su calidad en todas las esferas, por lo más bello de la vida: el conocimiento.

Gracias.

III. INDICE

Firmas.....	I
Agradecimientos.....	II
Índice.....	III
Glosario	IV
Resumen	V
1. Antecedentes.....	7
2. Planteamiento del problema.....	19
3. Objetivos.....	20
4. Material y Métodos	20
5. Resultados.....	21
6. Discusión	32
7. Conclusiones.....	35
8. Bibliografía.....	36

IV. GLOSARIO

ANA: anticuerpos antinucleares

Anti-CENP: anticuerpos contra proteína centromérica

CBP: cirrosis biliar primaria

CLIF: IF-ANA utilizando *Crithidia luciliae*

DM: dermatomiositis

DNA: ácido desoxirribonucleico

dsDNA: ácido desoxirribonucleico de doble cadena

EIA: inmunoensayo enzimático

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ENA: antígenos extraíbles del núcleo

ETC: Enfermedad del tejido conectivo

IC: intervalo de confianza

IF: Inmunofluorescencia

INCICH: Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

IF-ANA: Prueba de detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta

LES: Lupus eritematoso sistémico

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NAA: anticuerpo naturales

PM: polimiositis

RNA: ácido ribonucleico

ssDNA: ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla

tRNA: ácido ribonucleico de transferencia

V. RESUMEN

En el estudio de la enfermedad del tejido conjuntivo la determinación de ANA por inmunofluorescencia indirecta es una prueba indispensable. En la práctica clínica, es frecuente que la decisión de la realización de pruebas específicas subsecuentes, se base en el patrón de IF-ANA. Sin embargo, la literatura al respecto es confusa y la asociación entre patrones y especificidades no es determinante, con cierto grado de variabilidad entre los diversos estudios. Esto en parte pudiera estar en relación a que no hay un acuerdo general ni una estandarización de la clasificación de patrones de IF; hay superposición entre patrones, antígenos y enfermedades del tejido conectivo, y es una prueba operador dependiente que requiere de personal altamente entrenado. Hay diversos estudios que han investigado la asociación entre el patrón de IF y algunas especificidades antigénicas. Sin embargo, en nuestra población no contamos con información en relación a si estos datos son similares a lo reportado en la literatura.

Objetivos. Determinar el grado de congruencia entre los patrones de IF de los ANA y las especificidades anti-dsDNA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP y anti-Sm.

Métodos. Se revisaron las bitácoras del laboratorio de Inmunología o en su caso los expedientes electrónicos y/o físicos del INCICH entre el periodo del 1° de octubre de 2006 al 30 de mayo de 2010 y se recolectaron los datos de los pacientes que tuvieran cualquier diagnóstico, pero que por algún motivo tuvieran determinaciones de IF-ANA en células HEp-2, anti-dsDNA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP y anti-Sm como parte del protocolo de estudio de una posible enfermedad del tejido conectivo. Se realizó estadística descriptiva y prueba κ de Cohen no ponderada para determinar el grado de concordancia entre los patrones de IF reportados por laboratorio y las pruebas positivas para anti-dsDNA, Ro/SSA, La/SSB, RNP y Sm.

Resultados. Para el anti-dsDNA y el patrón homogéneo, el índice de κ fue de 0.24 con IC al 95% de 0.16 a 0.32 y para los anticuerpos anti-Ro/SSA el patrón MF tuvo un índice de κ de 0.1 con IC al 95% de 0.02 a 0.18. No se encontró asociación para otros patrones y otras especificidades.

Conclusiones. Se encontró concordancia para el patrón homogéneo y los anti-dsDNA y para el patrón moteado fino y los anti-Ro/SSA; sin embargo, esta asociación fue débil. No se encontró asociación para los otros patrones y especificidades estudiadas en esta población.

1. ANTECEDENTES

Las enfermedades del tejido conjuntivo (ETC) son un grupo de trastornos autoinmunes sistémicos que se caracterizan por la producción de autoanticuerpos que reconocen a diversos antígenos nucleares o citoplasmáticos denominados anticuerpos antinucleares (ANA) (1-3). Los autoanticuerpos son marcadores de inmunoinflamación crónica y de ETC, algunos de ellos son específicos para una enfermedad, mientras otros pueden encontrarse en diversas enfermedades (4). Los ANA son una clase específica de autoanticuerpos que tienen la capacidad de unirse y destruir ciertas estructuras intracelulares (3).

La producción de anticuerpos antinucleares (ANA) en ausencia de manifestaciones clínicas se denomina "autoinmunidad", mientras que los mismos anticuerpos acompañados de manifestaciones clínicas como artritis o glomerulonefritis pueden constituir una enfermedad autoinmune (1).

Los autoanticuerpos en las enfermedades reumáticas inmunoinflamatorias tienen como blancos preferenciales a estructuras celulares de importancia vital en las funciones celulares (4). Estas estructuras están compuestas de diferentes constituyentes, pero solo unos pocos de ellos van a fungir como autoantígenos con la posibilidad de incitar la producción de autoanticuerpos. Los autoantígenos tienen funciones importantes en la síntesis de DNA, en el procesamiento de mRNA, en la división celular y en la síntesis, secreción y degradación de proteínas. Los autoanticuerpos pueden bloquear las funciones biológicas de su antígeno afín. Muchos autoantígenos son proteínas de unión a DNA o RNA que están permanentemente o intermitentemente unidas a estos ácidos nucleicos (4).

Debido a que muchos autoantígenos migran entre el núcleo y el citoplasma o se asocian temporalmente con los cromosomas durante el ciclo celular, la designación de ANA no es muy precisa. El término ANA se utiliza en un amplio sentido para englobar a los autoanticuerpos dirigidos contra autoantígenos localizados en el núcleo y en el citoplasma celular. No todos los autoantígenos están estrictamente localizados en un compartimento celular, debido a que su función y sus concentraciones relativas en diferentes compartimentos varían dependiendo del estado fisiológico de la célula (4, 5).

Las pruebas de autoanticuerpos deben realizarse en el contexto de la sospecha clínica de una enfermedad autoinmune sistémica y no deben utilizarse como método de tamizaje para individuos asintomáticos debido a que es común encontrarlos, especialmente en familiares de primer grado de pacientes con enfermedad reumática sistémica (5). Asimismo, hay otras condiciones que pueden cursar con pruebas de ANA positivas como las enfermedades autoinmunes órgano-específicas, por ejemplo tiroiditis de Hashimoto y otras como la enfermedad hepática, las enfermedades virales, las malignas, las inflamatorias no autoinmunes o incluso el estrés fisiológico (5-7). La prevalencia de ANA positivos en población caucásica sana es de 3-5%, pero la prevalencia está fuertemente influenciada por la edad. Se ha estimado que el 10-15% de personas sanas mayores de 65 años tienen ANA positivos a una dilución de 1:320 y 32% a 1:40 (1). Además, los autoanticuerpos naturales (NAA), no conducidos por antígeno que ocurren espontáneamente, pueden encontrarse en 20 a 50% de los individuos sanos asintomáticos de todas las edades incluyendo neonatos. La mayoría de estos NAA son de tipo IgM y de baja afinidad. Los autoantígenos a los que están dirigidos son similares a los de las enfermedades autoinmunes. Estos anticuerpos muestran una extensa reacción cruzada (polirreactividad) con antígenos microbianos ambientales y haptenos; se piensa que esta polirreactividad es el reflejo de su papel inmunorregulador “fisiológico” en la depuración de patógenos (6).

Los autoanticuerpos detectados en el suero de pacientes con enfermedad autoinmune son probablemente una combinación heterogénea de NAA polirreactivos de baja afinidad de isotipo IgM y autoanticuerpos patogénicos monorreactivos de alta afinidad de isotipos IgG e IgA (6).

Hay un gran número de plataformas diagnósticas y una multitud de pruebas comerciales usadas para el tamizaje, detección y cuantificación de autoanticuerpos séricos. Dentro de las pruebas que pueden usarse para asistir el diagnóstico clínico de las ETC, la prueba de ANA es una de las más comúnmente utilizadas (3, 5). En conjunto con los datos clínicos y el examen físico, la determinación de los autoanticuerpos puede usarse como una herramienta de apoyo para el diagnóstico, monitoreo de la actividad y gravedad de la enfermedad y para predecir el pronóstico de las ETC (1, 5).

Las pruebas más utilizadas en la actualidad son la detección de ANA con microscopia de inmunofluorescencia indirecta (IF-ANA) usando como sustrato células HEp-2 y los métodos de inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Sin embargo, la IF-ANA es superior comparada con ELISA en la detección de ANA relevantes para el diagnóstico de ETC y enfermedades autoinmunes órgano-específicas (8). Esto ha llevado a la recomendación de la IF-ANA por la *Internacional Union of Immunology Societies* como prueba de elección para la detección de pacientes con síntomas compatibles con ETC (3, 5, 6). Antes del desarrollo de la prueba de IF-ANA, la preparación de la célula LE era el único método usado para el diagnóstico de LES (3). En 1948 Malcom Hargrave, Helen Richmond y el médico residente Robert Morton notaron la presencia de células, previamente no conocidas, en la médula ósea de un paciente con LES. Ellos las nombraron células LE y las describieron como leucocitos polimorfonucleares maduros, los cuales habían fagocitado el material nuclear liberado de otro leucocito. Este descubrimiento motivó el inicio de investigación de los ANA. En un experimento descrito en 1954, Seller y Coons usaron una monocapa de células fijadas y permeabilizadas. Esta técnica fue aplicada en el campo de las ETC en 1957 por George Friou (3, 7). El entendimiento de la autoinmunidad dio un gran paso adelante cuando la técnica de IF-ANA fue introducida en estudios que investigaban enfermedades inflamatorias. Desde entonces, la IF-ANA, ha sido la prueba más utilizada para el diagnóstico de las ETC (4, 8).

Para reportar los resultados de la prueba de IF-ANA se utilizan tres parámetros: 1) el sustrato, 2) patrón de IF y 3) títulos (6).

1) Sustrato

Inicialmente fueron utilizados diferentes sustratos como cortes tisulares, eritrocitos de pollo y células HeLa, pero después las secciones de hígado de rata o un compuesto de múltiples sustratos (estómago de ratón, hígado de rata y riñón) se convirtieron en el estándar. El uso de sustratos celulares diferentes para la detección de rutina de los autoanticuerpos derivó en múltiples técnicas "caseras", difíciles de reproducir e interpretar (4). En 1975, se introdujo el empleo de las células HEP-2, lo que aumentó la sensibilidad de la prueba e hizo menos problemática la interpretación de la reactividad de los autoanticuerpos con antígenos nucleares y citoplasmáticos (3, 4, 6). Las células HEP-2 son células cultivadas del carcinoma epidermoide laríngeo humano y están disponibles comercialmente en la forma de laminillas de vidrio prefijadas. La mayoría de los laboratorios del mundo las utilizan y en la actualidad son el sustrato recomendado para las pruebas de tamizaje de IF-ANA (3, 6, 9).

Las células HEP-2 proveen múltiples ventajas. Se cultivan en una laminilla de cristal y son permeabilizadas para permitir la entrada de anticuerpos hacia la célula. Las estructuras nucleares y citoplasmáticas se reconocen fácilmente ya que poseen grandes núcleos y citoplasma representativo. Además, forman una población homogénea sin mucha matriz extracelular que contiene un número considerable de células en división, muestran figuras mitóticas y la ocurrencia simultánea de todos los estadios del ciclo celular, todas estas características permiten la detección de antígenos que se expresan de una manera diferencial durante el ciclo celular (7, 8, 10). Sin embargo, algunas preparaciones comerciales de células HEP-2 no son adecuadas para la detección de anti-Ro/SSA. Esta es una desventaja importante, especialmente para caracterizar sueros con ANA negativos y anticuerpos anti-Ro/SSA positivos (7).

2) Título

El título de anticuerpos es directamente proporcional a la concentración del anticuerpo y se expresa con una escala cuantitativa de valores. El título de ANA puede ser útil en auxiliar al diagnóstico. Títulos de 1:160 o mayores se consideran positivos y requieren continuar el abordaje diagnóstico, aunque los títulos bajos o ausentes no excluyen la enfermedad (3, 5, 6). Una

expresión prominente de ANA, indicado por una alta titulación, pueden anteceder al establecimiento del diagnóstico clínico por muchos años y esto servir como una herramienta para seleccionar una estrategia de abordaje diagnóstico y de seguimiento (4). De hecho, un título bajo de ANA tiene baja probabilidad de revelar un resultado positivo en una prueba de anti-ENA convencional. Aunque, se debe tomar en cuenta que un título bajo de ANA puede ser oscurecido por la presencia de un título alto de ANA si existe otro patrón superpuesto en la misma muestra (10).

3) Patrones de IF

El método de IF-ANA, es un ensayo sencillo, económico y fácil de realizar que se ha utilizado para detectar un amplio rango de ANA y para su descripción, se utilizan distintos patrones de IF (3, 6-8). En la técnica de IF-ANA los anticuerpos del suero del paciente se unen a antígenos nucleares y esto a su vez con un complejo de anti-inmunoglobulina asociado a moléculas fluorescentes. La preparación completa se visualiza por microscopia de fluorescencia para detectar la tinción fluorescente. El patrón fluorescente se observa de acuerdo con la distribución celular de las partículas fluorescentes (homogénea, moteada, etc.), mostrando distintos patrones de IF que a su vez, pueden estar asociados con ciertas enfermedades autoinmunes (7).

Las células HEp-2 permiten el reconocimiento de más de 30 patrones diferentes nucleares y citoplasmáticos, los cuales están dados por hasta más de 100 diferentes autoanticuerpos.

Entre los múltiples patrones que han sido descritos, los patrones homogéneo, moteado, periférico, nucleolar y centromérico son los más comúnmente observados y de importancia clínica (3, 5, 10).

El patrón homogéneo nuclear sugiere la presencia de autoanticuerpos anti-histonas, anti-dsDNA nativo y/o anti-nucleosoma (complejo histona-DNA). Algunos autores incluyen el anti-Scl-70 en el diagnóstico diferencial del patrón homogéneo. En algunos casos puede observarse una tinción más intensa en el anillo nuclear en células en mitosis o en interfase (patrón anular o periférico). Esto también puede indicar la presencia de anticuerpos anti-dsDNA (1, 7, 8, 11).

Los patrones moteados nucleares son indicativos de autoanticuerpos que tienen por objetivo una gran familia de antígenos no-histonas. Se han descrito múltiples patrones moteados distintos y se

han relacionado con diferentes antígenos como objetivos. El moteado puede variar en tamaño con motas de grandes a muy finas y la forma ser muy uniforme o altamente irregular (7). El patrón moteado indica la presencia de autoanticuerpos contra RNP, Sm, U1-RNP, Ro/SSA, La/SSB, Ku, PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), RNA polimerasa II o Scl-70 (1, 8, 11).

Algunos estudios sugieren que los autoanticuerpos anti-Sm y anti-U1RNP pueden mostrar un patrón moteado grueso y los anti-Ro/SSA o anti-La/SSB un moteado fino. En algunos casos, en el patrón moteado fino, la tinción del núcleo es granulosa y uniforme, mostrando un patrón casi homogéneo (7).

El patrón centromérico es observado cuando hay anticuerpos contra el cinetocoro, observado en la esclerosis sistémica limitada (1, 7).

Los patrones nucleolares tienen especificidades principalmente observadas en pacientes con esclerosis sistémica o en síndromes de superposición con características clínicas de esclerosis sistémica, con unos pocos reportados en otras enfermedades no relacionadas. El patrón nucleolar de las células HEp-2 puede ser causado por una gran variedad de autoanticuerpos como son PM/Scl, To/Th, U3RNP, Scl-70 (Topoisomerasa-1), anti-RNA polimerasa I/III, que son altamente específicos de esclerosis sistémica y tienen un significado tanto diagnóstico como pronóstico (1, 7).

Los patrones citoplasmáticos revelan diferentes características y son indicativos de los distintos antígenos involucrados. El diagnóstico diferencial del patrón citoplásmico incluye anticuerpos anti-Ro/SSA, antígenos P ribosomales, anticuerpos contra la partícula de reconocimiento de señal (SRP), anticuerpos antimitocondriales y anticuerpos asociados a varias aminoacil-tRNA sintetasas (1, 7).

Desventajas de la IF-ANA

Aunque el patrón puede aportar pistas de la posible enfermedad y de los autoanticuerpos subyacentes, con excepción del patrón centromérico, la relevancia clínica del patrón de ANA es limitado y se requieren pruebas posteriores para establecer la especificidad de los antígenos de los ANA (4, 5). Las posibles causas son múltiples. Por un lado, aunque los patrones en células HEp-2 han sido descritos en múltiples sitios, no hay un acuerdo internacional o un uso estandarizado de

los términos y las reglas de interpretación, además el procedimiento es operador dependiente y recae en la experiencia de los técnicos que realizan su lectura (8, 9). Por otro lado, algunos autores, consideran que IF-ANA carece de especificidad debido a la superposición entre los patrones de tinción y las enfermedades, y sugieren que el advenimiento de autoanticuerpos más específicos ha disminuido el uso de los patrones de tinción (2). Aunque algunos patrones de tinción nuclear en la prueba de IF-ANA pueden estar asociados con ciertos anticuerpos, hay una considerable superposición, pueden ocurrir patrones mixtos en pacientes que contienen más de una especificidad (7). Múltiples autoanticuerpos nucleares frecuentemente están presentes simultáneamente y pueden interferir con el patrón de tinción normalmente producido por cada uno. La tinción homogénea puede además oscurecer otros patrones si el anticuerpo causal está presente a una concentración elevada (7, 11). Por tanto, los patrones de IF principales no son ni específicos ni diagnósticos de algún autoanticuerpo o entidad nosológica en la mayoría de los casos. Solo son indicativos de la presencia de un autoanticuerpo, por ello, su presencia debe ser verificada con otra prueba más específica (7).

Los ANA han sido categorizados en 2 principales grupos:

Anticuerpos anti-DNA e histonas.

Incluyen anticuerpos contra el DNA que fueron descubiertos en 1957, que pueden estar dirigidos contra el DNA de cadena sencilla (ssDNA) o de doble cadena (dsDNA), y los anticuerpos anti-histonas, descubiertos en 1971, los cuales son indicativos de lupus inducido por fármacos (3).

Anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA)

Los anticuerpos extraíbles del núcleo están dirigidos contra pequeñas proteínas ribonucleares no-histonas. Las proteínas ribonucleares juegan un papel importante en la transcripción del mRNA (2). Estos antígenos nucleares fueron nombrados ENA ya que originalmente eran extraíbles del núcleo con solución salina. Los más ampliamente conocidos son Sm, RNP, Ro/SSA, La/SSB (11). El anticuerpo contra el antígeno Smith (Sm) fue el primer anti-ENA descubierto en 1966. Posteriormente otros subtipos de anti-ENA (RNP, Ro/SSA, La/SSB, Scl-70, Jo-1 y PM1) fueron

identificados más claramente (3). El análisis de la reactividad a antígenos extraíbles del núcleo (ENA) puede ayudar a discriminar entre los diferentes tipos de enfermedades del tejido conjuntivo. Además del potencial diagnóstico de los anticuerpos anti-ENA, su detección también tiene importancia pronóstica (10). Además en los últimos años se han descrito una multitud de otros autoanticuerpos (anti-CENP, RNA polimerasa I/III, Mu, Ku, Mi-2, RA33, etc.) (3).

Los métodos de EIA o ELISA son los ensayos para la detección de anticuerpos específicos que reaccionan con un autoantígeno sencillo (por ejemplo dsDNA, Ro/SSA, La/SSB, Sm/RNP). En los ensayos específicos de antígeno, se recubren múltiples antígenos en placas de microtitulación, usualmente una combinación de Ro/SSA, La/SSB, Sm y RNP, con algunos incluyendo Jo-1 y Scl-70. Estas pruebas son altamente específicas y sensibles y disminuyen sustancialmente el tiempo involucrado en tamizar una gran cantidad de muestras de pacientes. Las pruebas son fáciles de realizar, pueden ser automatizadas y no requieren operadores altamente entrenados. Los EIA/ELISA se han convertido en el método más ampliamente utilizado no solo para el tamizaje de rutina sino también para la detección de ANA específicos. Por otro lado, las tres técnicas utilizadas en la actualidad para la detección de anticuerpos anti-dsDNA son la IF-ANA utilizando la *Crithidia luciliae* como sustrato (CLIF), el ensayo Farr y la prueba de ELISA. Aarden y sus colaboradores en 1975 utilizaron la prueba de IF-ANA para la detección de anticuerpos anti-dsDNA usando un hemoflagelado, la *C. luciliae* como sustrato. Este organismo contiene una organela intracelular el cinetoplasto, la cual contiene una alta concentración de dsDNA mientras aparentemente no contiene otros antígenos nucleares reconocibles. Esta prueba es la más útil en el diagnóstico primario de LES con alta especificidad comparado con ELISA (3).

Utilidad de los ANA.

La detección de ANA puede apoyar fuertemente el diagnóstico de múltiples enfermedades reumáticas (esclerosis sistémica, dermatomiositis/polimiositis, artritis idiopática juvenil en su forma oligoarticular, etc.), incluso, algunos ANA se incluyen en los criterios de clasificación de la enfermedad (por ejemplo lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo o síndrome de Sjögren). En los últimos años un número creciente de autoanticuerpos contra

antígenos nucleares, nucleolares y citoplasmáticos se han reconocido en las enfermedades reumáticas sistémicas. Aunque algunas enfermedades particulares pueden estar asociadas con ciertos anticuerpos “marcadores” (por ejemplo en la enfermedad mixta del tejido conectivo los anticuerpos anti-RNP o los anticentroméricos con esclerosis sistémica limitada) es más frecuente que las enfermedades estén caracterizadas por perfiles de anticuerpos con la presencia de ciertos anticuerpos definidos y la ausencia de otros (11).

La prueba de IF-ANA es sensible, ya que se detectan ANA en más del 95% de los pacientes con LES (2). Una prueba negativa de ANA está asociada con un alto valor predictivo, un resultado negativo indica que hay una probabilidad menor de 0.14% de tener LES, pero tiene una especificidad diagnóstica baja para esta enfermedad (20 a 35%) (2). Por ello, es importante confirmar e identificar la especificidad inmunológica/antigénica de las pruebas de IF-ANA positivas por pruebas más definitivas (6). Comparado con LES, la prueba de IF-ANA tiene una baja sensibilidad y especificidad para otras enfermedades del tejido conjuntivo (2). El ensayo de IF usando HEp-2 es un buen método inicial de tamizaje para la detección de ANA, pero no es específico para un diagnóstico en particular (7, 8). Provee información de la presencia de autoanticuerpos séricos así como la localización subcelular de los antígenos que reconoce (1).

El tamizaje de autoanticuerpos específicos de enfermedad, puede ser útil en individuos asintomáticos con ANA positivos para evaluar el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune sistémica como LES, PM/DM, esclerosis sistémica, Síndrome de Sjögren, AR o cirrosis biliar primaria (CBP) en el futuro. En pacientes con enfermedad sistémica autoinmune conocida o sospechada, un panel de marcadores específicos puede ayudar a establecer el diagnóstico y valorar el pronóstico de la enfermedad (1).

La producción de autoanticuerpos puede anunciar la aparición de una enfermedad autoinmune, especialmente en el caso de presentar autoanticuerpos específicos de enfermedad, lo cual puede aparecer, meses, años o incluso décadas. La detección de estos autoanticuerpos específicos de enfermedad en individuos asintomáticos puede permitir el diagnóstico temprano y el tratamiento preventivo. Un ejemplo de ello son los anticuerpos antimitocondriales en la CBP (1).

Se han reportado una gran variedad de autoanticuerpos que preceden el inicio de LES. Los ANA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB y los anticuerpos antifosfolípidos pueden presentarse por periodos prolongados antes del inicio de la enfermedad autoinmune, mientras los anti-Sm y anti-RNP aparecen mas cercanamente al inicio de la enfermedad. Los anti-DNA aparecen en un rango intermedio (1). Los autoanticuerpos asociados a esclerosis sistémica, también aparecen antes del inicio de la enfermedad. Por ejemplo, los anticuerpos anti-centrómero pueden desarrollarse años antes del inicio de la enfermedad. Los anti-Scl70 (topoisomerasa I) son marcadores de esclerosis sistémica difusa y están fuertemente asociados con el desarrollo subsecuente de engrosamiento cutáneo. Los anticuerpos contra las sintetasas de tRNA también pueden ser observadas muchos años antes del desarrollo de miositis. Los autoanticuerpos además frecuentemente preceden el inicio de la artritis reumatoide, como los anticuerpos anti-péptidos citrulinados. Todos estos datos indican que las autoanticuerpos específicos de enfermedad son predictores útiles del desarrollo futuro de las enfermedades autoinmunes (1).

Un estudio realizado por Arbuckle y colaboradores, mostró que no solo los autoanticuerpos específicos de enfermedad, sino también los ANA están presentes muchos años antes del diagnóstico de lupus eritematoso sistémico. Sin embargo, el valor diagnóstico de cualquier determinación de autoanticuerpos depende fuertemente de la presentación clínica (7).

ANA a títulos altos, especialmente con un patrón moteado atípico o centromérico, casi siempre favorece la identificación de una especificidad de ANA. Basado en esto, la realización de una prueba de anti-ENA depende del título y del patrón de IF (10). Aunque otros autores sugieren que cuando una prueba de ANA por IF es positiva (independientemente del título o patrón), son necesarias pruebas subsecuentes para detectar autoantígenos específicos. Los resultados de estas pruebas pueden aportar más información que los ANA aislados debido a que algunos de ellos son específicos de alguna enfermedad (5). Aunque, por razones logísticas, puede ser más fácil realizar el ensayo completo de los anticuerpos convencionales anti-ENA en muestras que son positivas para ANA en patrones y títulos relevantes (10).

Las pruebas con mayor especificidad que pueden apoyar el diagnóstico de LES incluyen los anti-dsDNA y los anti-Sm (Smith). Algunos autores proponen que las pruebas de especificidades de

ANA (por ejemplo anti-dsDNA) deben realizarse solo en pacientes con una prueba de ANA positiva con características sugestivas de una enfermedad del tejido conjuntivo en particular y en pacientes con ANA negativos con enfermedad del tejido conjuntivo conocida o sospechada y sugieren que en muchos casos no es necesario realizar pruebas específicas cuando el tamizaje de ANA por IF ha sido negativo (2, 5). Los anticuerpos anti Sm, dsDNA, antígenos P ribosomales y PCNA son altamente específicos de LES (1, 2). Los anticuerpos anti-Sm son virtualmente patognomónicos de LES y se detectan en aproximadamente 25-30% de los pacientes con LES. Los anti-RNP están asociados con Sm pero no son específicos de la enfermedad. Su prevalencia es de 20-40% en pacientes con LES. Los anticuerpos anti-P ribosomal se han reportado en manifestaciones neuropsiquiátricas de LES y son altamente específicos de esta entidad. Los anticuerpos dirigidos contra U1RNP pueden encontrarse en pacientes diagnosticados con enfermedad mixta del tejido conjuntivo (1, 2).

Los anti-Ro/SSA y La/SSB se observan en el síndrome de Sjögren y otras enfermedades sistémicas autoinmunes, como LES, miositis y esclerosis sistémica cuando están acompañadas de síndrome seco. Los anti-Ro se encuentran en el 10-50% de pacientes con LES y 60-80% de pacientes con síndrome de Sjögren primario. Aproximadamente 10-20% de los pacientes con LES y un porcentaje un poco más alto de pacientes con síndrome de Sjögren son positivos para anti-La/SSB. Los anti-La están casi siempre asociados con anti-Ro mientras que los anti-Ro frecuentemente se detectan sin anti-La/SSB. La presencia de anti-SSA/Ro en pacientes con LES está asociada con lupus cutáneo subagudo e incremento del riesgo de bloqueo cardíaco congénito. La presencia de anti-La/SSB se asocia con alto riesgo de LES de inicio tardío, síndrome de Sjögren secundario y síndrome de lupus neonatal (1, 2).

La polimiositis (PM) y la dermatomiositis (DM) se asocian con autoanticuerpos contra un grupo de aminoacil tRNA sintetasas, los más comunes son los anti-Jo-1 (histidil tRNA sintetasa), los cuales se encuentran en 20-25% de los casos de miositis de adultos. Otros autoanticuerpos de este grupo se encuentran en 1-4% de los casos. Todos ellos son altamente específicos para miositis y se asocian con una constelación de síntomas que constituyen el síndrome de autoanticuerpos antisintetasa. Los anti-SRP son altamente específicos para polimiositis y están asociados con

enfermedad grave. Los anti-Mi2 son un marcador de DM y generalmente están asociados a un pronóstico relativamente más favorable a largo plazo (1).

Los anticuerpos anti-Scl-70 son prácticamente patognomónicos de la esclerosis sistémica y predictores de involucro a órganos internos, escleroderma proximal y pobre pronóstico. Los anti-RNA polimerasa I/III están asociados con enfermedad grave y mal pronóstico. Estos son marcadores específicos de enfermedad, con una sensibilidad de 21% y una especificidad del 100% (1).

Los anticuerpos antifibrilarina, específicos para la pequeña ribonucleoproteína U3, son casi 100% específicos para esclerosis sistémica y se encuentran en 2-8% de los pacientes. La frecuencia de anti-Th es de aproximadamente 4%. Los pacientes con esclerosis sistémica limitada y patrón centromérico tienen una alta probabilidad de desarrollar manifestaciones del síndrome de CREST (**C**alcinosis, **F**enómeno de Raynaud, alteraciones **E**sofágicas, **e**Sclerodactilia y **T**elangiectasias). Los autoantígenos reconocidos más comúnmente en los sueros de estos pacientes son las proteínas centroméricas (1).

Estudios de asociación entre IF-ANA y especificidades.

Entre los estudios que han investigado la asociación entre el patrón IF-ANA y las especificidades finas de ANA, se encuentra el de Wangel y colaboradores publicado en 1984. Este estudio se diseñó en base a que estudios previos habían mostrado que los anticuerpos contra componentes del complejo anti-ENA tendían a estar asociados con un patrón moteado en la prueba de IF-ANA, por lo que estos investigadores estudiaron la asociación entre el patrón de IF y los anticuerpos anti-ENA (Sm, RNP, Ro/SSA y La/SSB). Ellos encontraron que la probabilidad de que un suero dado tuviera los anti-ENA se podía predecir con base en el patrón de tinción. Así, el 61% de sueros con patrón moteado presentó anticuerpos anti-ENA, mientras que solo 8% de los sueros con patrón homogéneo y 1% con patrón fibrilar fueron positivos para anti-ENA (11).

Otro estudio a este respecto, es el realizado por Peene y sus colaboradores para la identificación de ANA en una cohorte de pacientes donde se analizaron 15 937 muestras consecutivas. En las muestras positivas para ANA (23.5% de las muestras) se realizaron pruebas de CLIF, EIA e

inmunoensayos para la detección de antígenos específicos. Estos investigadores encontraron al menos una especificidad en 21.1% de las muestras con ANA positivos: anti-dsDNA en 3.2%, anti-ENA en 15.8% (anti-Ro/SSA 10.5%, anti-La/SSB 6.7%, anti-RNP 2.7%, anti-Sm 1.8%, anti-Scl70 1.2% y anti-Jo-1 0.2%). Se encontraron especificidades múltiples en 7.9% de las muestras ANA positivas. Los patrones de IF más frecuentemente encontrados fueron el patrón moteado (42%), homogéneo (41%) y nucleolar (10%). Además determinaron la probabilidad de detectar un antígeno específico de acuerdo al patrón e intensidad de fluorescencia. A mayor intensidad de fluorescencia en el tamizaje inicial de ANA, más alta la tasa de detección de especificidades. En el caso de intensidades bajas los anti-Ro/SSA o anti-La/SSB se detectaron preferentemente. Cuando se confrontaron con los patrones homogéneos más fuertes en intensidad de fluorescencia, los anti-dsDNA se encontraron en el 36.6% y los anti-Ro/SSA/La/SSB en el 26.8%. Los patrones moteados más fuertes en intensidad de fluorescencia se encontraron en el 51.7% de las muestras con RNP y en el 34.5% con anti-SSA/SSB. No se encontraron otros anticuerpos además de anti-Ro/SSA/La/SSB en el patrón centromérico (12).

El comportamiento del perfil de autoanticuerpos y la asociación de los patrones por IF-ANA ha sido estudiado en otros centros, sin embargo, en los pacientes que acuden a consulta en el Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” no han sido explorados y desconocemos si su comportamiento es similar a lo reportado en la literatura

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la determinación de ANA por inmunofluorescencia indirecta continúa siendo la prueba inicial más útil para el estudio de las enfermedades reumáticas autoinmunes. Esta prueba se reporta en términos de título y patrón de IF. Múltiples estudios sugieren que las pruebas subsecuentes de las especificidades antigénicas de los ANA deben ser realizadas en base al patrón de IF y los títulos de ANA. Sin embargo, otros estudios han mostrado que los patrones de IF de los ANA no son específicos para predecir el tipo de autoanticuerpo contra el que están dirigidos debido a diversas razones. Entre las más importantes, destacan, que hay superposición entre los patrones, las especificidades y las enfermedades autoinmunes; no hay un consenso general ni una estandarización mundial en relación a los patrones de IF y los antígenos que representan; y que la prueba de IF-ANA es operador dependiente y requiere un personal altamente entrenado. A pesar de ello, es frecuente en la práctica clínica, que la decisión de realizar pruebas subsecuentes de especificidades dependa del patrón de IF y/o su título y se enfoque únicamente a solicitar aquellas especificidades que tradicionalmente se han relacionado con cierto patrón de IF, por ejemplo, solicitar únicamente anticuerpos anti-dsDNA ante un patrón homogéneo, o por otro lado, no realizar estudios de especificidades cuando una prueba ha tenido un título bajo o negativo. En el departamento de Reumatología del Instituto Nacional de Cardiología no se ha estudiado si hay congruencia entre los patrones de IF, los títulos y las especificidades que se realizan en el laboratorio de Inmunología, ni tampoco las características demográficas ni el perfil inmunológico de los pacientes que tienen sospecha o diagnóstico de enfermedad autoinmune.

3. OBJETIVOS

- Determinar el grado de congruencia entre el patrón de IF de los ANA y las especificidades anti-dsDNA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP y anti-Sm.
- Determinar los patrones de IF y las especificidades mas frecuentes en la población de estudio
- Determinar la relación entre el titulo de ANA y la presencia de pruebas positivas para las especificidades antigénicas anti-dsDNA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP y anti-Sm.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Tipo de Estudio

Es un estudio observacional, descriptivo, con colección retrolectiva de datos.

4.2 Ubicación Temporal y Espacial

Se obtuvieron los datos de los registros del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” (INCICh) en el período entre el 1º de octubre de 2006 al 31 de mayo de 2010.

4.3. Criterios de Selección

Criterios de Inclusión. Pacientes del INCICh con cualquier diagnóstico, que tuvieron determinaciones de ANA por inmunofluorescencia indirecta en células HEp-2 reportando patrón de IF y título, así como determinación de anti-dsDNA por CLIF y determinación de anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro/SSA y anti-La/SSB por método de ELISA utilizados en nuestra institución en el periodo del 1º de octubre de 2006 al 30 de mayo de 2010.

Criterios de Exclusión. Pacientes del INCICh con cualquier diagnóstico, que no tuvieron determinación de ANA por inmunofluorescencia indirecta reportando patrón de IF y título o que no tuvieran determinación de anti-dsDNA, anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro/SSA o anti-La/SSB.

Criterios de Eliminación. Casos con datos incompletos.

4.4. Descripción Operativa del Estudio

Se realizó un estudio observacional exploratorio con colección retrolectiva de los datos de aquellos casos que tuvieran una prueba de ANA por IF (IF-ANA) en células HEp-2, determinaciones de anti-dsDNA por CLIF (inmunofluorescencia por *Crithidia lucilliae*) y de anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP y anti-Sm por ELISA, entre el 1º de octubre de 2006 al 31 de mayo de 2010, basado en un registro del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de cardiología “Dr. Ignacio Chávez”. Después se realizó una revisión retrospectiva de los expedientes electrónicos o físicos conforme fuera necesario, donde se obtuvieron los siguientes datos: edad, género, diagnóstico, registro, fecha de estudio, ANA (patrón y título), anti-dsDNA (positivo o negativo), anti-Ro/SSA (positivo o negativo), anti-La/SSB (positivo o negativo), anti-RNP (positivo o negativo) y anti-Sm (positivo o negativo).

4.5. Análisis Estadístico

Se utilizó estadística descriptiva reportando los resultados como promedios, DE o porcentajes. Se calculó el índice κ no ponderado de Cohen para determinar el grado de congruencia entre los patrones de inmunofluorescencia y las 5 especificidades. Se interpretó como el índice de kappa de acuerdo a su valor: ≤ 0 sin congruencia, > 0 congruencia débil, ≥ 0.4 pero ≤ 0.75 congruencia aceptable, ≥ 0.75 congruencia excelente.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa JMP versión 7.0

5. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las características demográficas de la población de estudio. El promedio de edad fue de 40 años con una DE \pm 14.2. Predominó el género femenino con un 81%.

El 71% tuvo una enfermedad reumatológica como diagnóstico primario, siendo el diagnóstico más frecuente el de lupus eritematoso sistémico en 21% de los pacientes, seguido de SAAF primario (15%) y artritis reumatoide (4.5%). En el caso de pacientes con diagnóstico primario no reumatológico, hubo predominio de las enfermedades cardiopulmonares y renales.

TABLA 1.	
CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	n (%)
Edad \pm (DE)	40 \pm 14.2
Género femenino	719 (81)
Diagnóstico	
Enfermedad reumatológica	629 (71)
AIJ	6 (0.7)
AR	40 (4.5)
LES	189 (21.3)
Esclerosis sistémica	19 (2.1)
Síndrome de Sjögren primario	23 (2.6)
SAAF primario	138 (15.6)
Síndrome de superposición	95 (10.7)
Enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo	47 (5.3)
Miopatías inflamatorias idiopáticas	6 (0.7)
FM/OA	32 (3.6)
Vasculitis	17 (2)
Espondiloartritis	4 (0.5)
Otras enfermedades reumáticas	13 (1.5)
Enfermedad no reumatológica	256 (29)
Cardiopulmonar	130 (14.7)
Renal	47 (5.3)
Neurológica	40 (4.5)
Hematológica	24 (2.7)
Malignidades	7 (0.8)
Otras enfermedades no reumáticas	8 (0.9)

En la tabla 2 se muestran las características de los estudios inmunológicos de la población. Los patrones de IF más frecuentes fueron el moteado fino y el homogéneo (35 y 30% respectivamente). El título más frecuente fue 1:160 y el más infrecuente 1:5120. En relación a las especificidades, la más frecuente fue anti-dsDNA en 155 muestras (17%), seguida de anti-Ro en 131 (14% de las muestras). Las menos frecuentes fueron anti-Sm y anti-La (5%).

TABLA 2.	
	<i>n (%)</i>
Patrón de IF	
Negativo	99 (12)
Moteado fino (MF)	311 (35)
Moteado grueso (MG)	42 (5)
Homogéneo	268 (30)
Nucleolar	27 (3)
Centromérico	19 (2)
Otro patrón	119 (13)
Título	
Negativo	98 (11)
1:40	86 (10)
1:80	30 (3)
1:160	283 (32)
1:320	77 (9)
1:640	118 (13)
1:1280	72 (8)
1:2560	81 (9)
1:5120	40 (5)
Anti-ADN	155 (17)
Anti-Ro	131 (14)
Anti-La	52 (5)
Anti-Sm	51 (5)
Anti-RNP	109 (12)

En la tabla 3 se muestra los títulos y los patrones de la población estudiada. Un total de 885 casos se incluyeron en el estudio. Del total 99 muestras (11%) tuvieron ANA negativos. El patrón de IF más frecuente fue el moteado fino con un total de 311 muestras (35%), seguido del patrón homogéneo en 268 (30%). En relación a los títulos de ANA, un título de 1:160 fue el más frecuente con 283 (31%) de las muestras, en segundo lugar los títulos de 1:640. Solo el 4.5% de las muestras tuvo la titulación más alta de 1:5120. El 75% de las muestras tuvo un título \geq 1:160.

TABLA 3.										
n	TÍTULO									
Total %										
PATRÓN	0	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	Total
Negativo	99	0	0	0	0	0	0	0	0	99
	11.19	0	0	0	0	0	0	0	0	11.19
Moteado fino	0	44	11	122	25	37	29	28	15	311
	0	4.97	1.24	13.79	2.82	4.18	3.28	3.16	1.69	35.14
Moteado grueso	0	7	4	22	2	5	1	1	0	42
	0	0.79	0.45	2.49	0.23	0.56	0.11	0.11	0	4.75
Homogéneo	0	14	6	81	30	58	27	36	16	268
	0	1.58	0.68	9.15	3.39	6.55	3.05	4.07	1.81	30.28
Nucleolar	0	2	2	3	3	6	4	3	4	27
	0	0.23	0.23	0.34	0.34	0.68	0.45	0.34	0.45	3.05
Centromérico	0	0	0	1	1	2	3	9	3	19
	0	0	0	0.11	0.11	0.23	0.34	1.02	0.34	2.15
Otro	0	18	7	54	16	10	8	4	2	119
	0	2.03	0.79	6.10	1.81	1.13	0.90	0.45	0.23	13.45
Total	99	85	30	283	77	118	72	81	40	885
	11.19	9.60	3.39	31.98	8.70	13.33	8.14	9.15	4.52	

En la tabla 4 se muestran los patrones de inmunofluorescencia y los títulos de los autoanticuerpos anti-dsDNA, con un total de 155 pacientes positivos para esta especificidad. De estos, el 7% de las muestras fue negativo para ANA pero positivo para anti-dsDNA. El patrón de IF más frecuente en las muestras positivas para anti-dsDNA fue el patrón homogéneo representando un 55% del total,

seguido del patrón MF (21%) y otros patrones 10% (que incluyen patrones citoplásmico, NuMA, PCNA, anular o periférico, entre otros).

El mayor número de muestras positivas que tenían un patrón homogéneo fue a títulos de 1:2560.

En general la mayor proporción de los casos positivos se encontraron a títulos $\geq 1:640$ (43% del total de muestras positivas), aunque el 8% del total de muestras se encontró a títulos de 1:160 y solo dos casos a títulos $\leq 1:80$.

En el patrón MF el mayor número de casos ocurrió a títulos de 1:2560 y de igual manera la mayor proporción de casos (15% del total de muestras) se encontró con títulos $\geq 1:640$.

En relación a los títulos, en general, la mayoría de casos se presentó a títulos de $1 > 2560$ (24%), encontrando la mayor parte (64%) de las muestras positivas para anti-dsDNA a títulos $\geq 1:640$. El 18% a títulos de 1:160 y 10% a títulos menores.

n Total % PATRÓN	TÍTULO									TOTAL
	0	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
NEGATIVO	11 7.10	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	11 7.10
MF	0 0	1 0.65	0 0	8 5.16	1 0.65	7 4.52	3 1.94	10 6.45	4 2.58	34 21.94
MG	0 0	0 0	0 0	1 0.65	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0.65
HOMOGENEO	0 0	1 0.65	1 0.65	13 8.39	5 3.23	18 11.61	11 7.10	25 16.13	12 7.74	86 55.48
NUCLEOLAR	0 0	1 0.65	1 0.65	0 0	0 0	1 0.65	1 0.65	0 0	0 0	4 2.58
CENTROMERICO	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0.65	0 0	1 0.65	1 0.65	3 1.94
OTROS	0 0	0 0	1 0.65	6 3.87	4 2.58	2 1.29	0 0	2 1.29	1 0.65	16 10.32
TOTAL	11 7.10	3 1.94	3 1.94	28 18.06	10 6.45	29 18.71	15 9.68	38 24.52	18 11.61	155

En la tabla 5 se muestran los títulos y patrones de IF de los casos con anticuerpos anti-Ro positivos. El 4.5% de las muestras con anti-Ro positivas tuvieron ANA por IF negativos.

El patrón de IF más frecuente fue el MF representando el 48% del total de muestras. De este, el mayor número se encontró a títulos de 1:2560 (9.9% del total de muestras) y la mayor proporción de casos se encontró a títulos $\geq 1:640$. Sin embargo, 11% del total de muestras se encontró a títulos de 1:160. El segundo patrón en frecuencia fue el patrón homogéneo, con un 32% del total de muestras, encontrando la mayor parte de los casos a títulos de $\geq 1:640$ (30% del total de muestras). Solo 3 casos se encontraron en este patrón a títulos $\leq 1:320$.

En el 6% se encontró el grupo denominado "otros" patrones. El resto de los casos se distribuyó de manera similar en patrón moteado grueso (4%), nucleolar (2%) y centromérico (2%).

En relación a los títulos el mayor número de casos (29%) se encontró a títulos de 1:2560. En general, el 73% se encontró con títulos $\geq 1:640$ y el 23% con títulos ≤ 160 .

TABLA 5. ANTI-Ro									
n Total % PATRÓN	TÍTULO								TOTAL
	0	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
NEGATIVO	6	0	0	0	0	0	0	0	6
	4.58	0	0	0	0	0	0	0	4.58
MF	0	2	15	3	10	12	13	8	63
	0	1.53	11.45	2.29	7.63	9.16	9.92	6.11	48.09
MG	0	1	0	0	2	0	1	0	4
	0	0.76	0	0	1.53	0	0.76	0	3.05
HOMOGENEO	0	0	2	1	10	7	14	9	43
	0	0	1.53	0.76	7.63	5.34	10.69	6.87	32.82
NUCLEOLAR	0	0	0	0	1	1	0	1	3
	0	0	0	0	0.76	0.76	0	0.76	2.29
CENTROMERICO	0	0	0	0	1	0	0	2	3
	0	0	0	0	0.76	0	0	1.53	2.29
OTROS	0	0	4	1	2	1	1	0	9
	0	0	3.05	0.76	1.53	0.76	0.76	0	6.87
TOTAL	6	3	21	5	26	21	29	20	131
	4.58	2.29	16.03	3.82	19.85	16.03	22.14	15.27	

En la tabla 6 se muestran los patrones de IF y los títulos de las muestras positivas para anticuerpos anti-La/SSB (n=52). El 5.7% del total de las muestras fue negativo para detección de ANA. El patrón de IF mas frecuente fue el MF representando casi la mitad (48%) del total de las muestras. El mayor número de casos se presento a títulos $\geq 1:640$. Hubo solamente 3 casos a títulos de 1:160 y ningún caso por debajo de este titulo. El segundo patrón más frecuente fue el patrón homogéneo con 36% de los casos, con la mayor parte de los casos a títulos $\geq 1:640$. No hubo ninguna muestra reportada con los patrones moteado grueso y centromérico y solo un caso reportado como patrón nucleolar. El resto se encontró en el grupo de "otros" patrones (7.6%).

En cuanto a los títulos, la mayoría de casos se encontró a títulos de 1:2560 (26.9%), con el 80% de muestras a títulos ≥ 640 .

TABLA 6.		ANTI-La						
n Total % PATRÓN	TÍTULO							TOTAL
	0	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
NEGATIVO	3	0	0	0	0	0	0	3
	5.77	0	0	0	0	0	0	5.77
MF	0	3	1	3	5	8	5	25
	0	5.77	1.92	5.77	9.62	15.38	9.62	48.08
HOMOGENEO	0	1	0	4	4	6	4	19
	0	1.92	0	7.69	7.69	11.54	7.69	36.54
NUCLEOLAR	0	0	0	0	1	0	0	1
	0	0	0	0	1.92	0	0	1.92
OTROS	0	2	0	1	1	0	0	4
	0	3.85	0	1.92	1.92	0	0	7.69
TOTAL	3	6	1	8	11	14	9	52
	5.77	11.54	1.92	15.38	21.15	26.92	17.31	

En la tabla 7 se muestran los patrones y títulos de las muestras positivas para anticuerpos anti-Sm (n=51). El 3% del total de muestras fue negativo para ANA. El patrón más frecuente de IF fue el MF donde se encontró el 39% de las muestras, con la mayor proporción a títulos $\geq 1:640$. Solo 3 casos se encontraron a títulos $\leq 1:320$. El segundo patrón más frecuente fue el homogéneo con 37%, todos los casos con títulos $\geq 1:640$. En el patrón MG solo se reporto un caso. Ningún caso fue reportado como patrón nucleolar y solo 1 como patrón centromérico. El resto de casos se encontró dentro del grupo de "otros" patrones.

En relación a los títulos, el 74% tuvo títulos ≥ 640 , con el mayor numero (35%) a títulos de 1:2560. El resto de casos se presentaron predominantemente a títulos de 1:160 o títulos menores.

TABLA 7. ANTI-Sm									
n Total % PATRÓN	TÍTULO								TOTAL
	0	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
NEGATIVO	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	3.92	0	0	0	0	0	0	0	3.92
MF	0	1	1	1	2	2	8	5	20
	0	1.96	1.96	1.96	3.92	3.92	15.69	9.80	39.22
MG	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	0	0	1.96	0	0	0	0	0	1.96
HOMOGENEO	0	0	0	0	3	2	9	5	19
	0	0	0	0	5.88	3.92	17.65	9.80	37.25
CENTROMERICO	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	0	0	0	0	1.96	0	0	0	1.96
OTROS	0	0	5	2	0	0	1	0	8
	0	0	9.80	3.92	0	0	1.96	0	15.69
TOTAL	2	1	7	3	6	4	18	10	51
	3.92	1.96	13.73	5.88	11.76	7.84	35.29	19.61	

En la tabla 8 se muestran los títulos y patrones de IF de las muestras que tuvieron resultado positivo para anticuerpos anti-RNP. El 4.5% de las muestras fue positivo para esta especificidad pero negativo para ANA. Los patrones de IF mas frecuentes fueron el MF y el homogéneo

representando el 40 y el 36% del total de muestras respectivamente. Para ambos grupos el mayor número de casos se encontró a títulos $\geq 1:640$, con algunos casos a títulos $\leq 1:320$. El patrón moteado grueso solo se reportó en el 2.7% de las muestras, al igual que el patrón nucleolar. Solo un caso se reportó como patrón centromérico y el resto de casos ocurrió dentro del grupo de "otros" patrones.

En cuanto a los títulos, el mayor número de casos se presentó a títulos $\geq 1:640$, siendo 23% a títulos de 1:2560 donde se encontró la mayoría de los casos. Un porcentaje considerable (13%) se presentó a títulos de 1:160.

En la tabla 9 se muestra la distribución de acuerdo al resultado de las pruebas de ELISA de las diferentes especificidades. El 69% de los pacientes tuvieron las 5 especificidades negativas y 31% de las muestras tuvieron al menos una de las cinco especificidades positiva.

TABLA 8. ANTI-RNP									
n Total % PATRÓN	TÍTULO								TOTAL
	0	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
NEGATIVO	5 4.59	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	5 4.59
MF	0 0	2 1.83	4 3.67	3 2.75	7 6.42	6 5.50	12 11.01	10 9.17	44 40.37
MG	0 0	1 0.92	1 0.92	0 0	0 0	1 0.92	0 0	0 0	3 2.75
HOMOGENEO	0 0	1 0.92	2 1.83	2 1.83	8 7.34	6 5.50	13 11.93	8 7.34	40 36.70
NUCLEOLAR	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0.92	1 0.92	0 0	1 0.92	3 2.75
CENTROMERICO	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0.92	0 0	0 0	0 0	1 0.92
OTROS	0 0	0 0	8 7.34	2 1.83	1 0.92	1 0.92	1 0.92	0 0	13 11.93
TOTAL	5 4.59	4 3.67	15 13.76	7 6.42	18 16.51	15 13.76	26 23.85	19 17.43	109

Solo 10 pacientes (1%) tuvieron las 5 especificidades positivas. El 14% de los pacientes tuvieron una especificidad positiva, siendo la mas frecuente anti-dsDNA (8%) seguido de anti-Ro en el 5% y la especificidad aislada menos frecuente fue anti-Sm encontrándose solo en un paciente (0.1%). El 8% de los pacientes tuvieron dos especificidades positivas, siendo las combinaciones más frecuentes anti-Ro/SSA y La/SSB, anti-dsDNA y anti-RNP o anti-dsDNA y anti-Ro/SSA. Solo el 3.6% y el 2.3% fueron positivas a 3 y 4 especificidades respectivamente.

TABLA 9.

DNA	Ro	La	Sm	RNP	Número	%
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	612	69
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	25	3
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	1	0.11
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	11	1
Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	6	1
Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	41	5
Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	7	1
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	2	0.23
Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	21	2
Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	4	0.45
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	72	8
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	15	2
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	11	1
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	1	0.11
Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	15	2
Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	5	1
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	16	2
Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	7	1
Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	3	0.34
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	10	1

Para establecer la congruencia entre los patrones de IF y las 5 especificidades finas se utilizó el índice de κ . En relación al anti-dsDNA y el patrón homogéneo, el índice de κ fue de 0.24 con IC al 95% de 0.16 a 0.32. El resto de los patrones tuvo un índice negativo con IC al 95% no significativos (Tabla 10).

TABLA 10. Anti-DNA			
Patrón IF	Índice κ	IC 95%	
Negativo	-0.06	-0.17	a 0.06
MF	-0.11	-0.20	a -0.03
MG	-0.07	-0.20	a 0.06
Homogéneo	0.24	0.16	a 0.32
Nucleolar	-0.01	-0.14	a 0.13
centromérico	0	-0.14	a 0.13
Otros	-0.04	-0.15	a 0.07

Para los anticuerpos anti-Ro el patrón MF tuvo un índice de κ de 0.1 con IC al 95% de 0.02 a 0.18. El resto de patrones tuvo índices κ con IC al 95% no significativos (Tabla 11).

TABLA 11. Anti-Ro			
Patrón IF	Índice κ	IC 95%	
Negativo	-0.09	-0.21	a 0.04
MF	0.10	0.02	a 0.18
MG	-0.03	-0.17	a 0.11
Homogéneo	0.02	-0.07	a 0.11
Nucleolar	-0.01	-0.16	a 0.13
centromérico	0	-0.15	a 0.15
Otros	-0.08	-0.20	a 0.04

Para las especificidades anti-La, anti-Sm y anti-RNP los índices κ y los IC al 95% no fueron significativos (Tablas 12, 13 y 14).

TABLA 12. Anti-La			
Patrón IF	Índice κ	IC 95%	
Negativo	-0.04	-0.20	a 0.11
MF	0.04	-0.04	a 0.13
MG			
Homogéneo	0.02	-0.07	a 0.12

Nucleolar	-0.02	-0.23	a 0.20
centromérico			
Otros	-0.04	-0.18	a 0.11

TABLA 13. Anti-Sm			
Patrón IF	Índice κ	IC 95%	
Negativo	-0.05	-0.21	a 0.10
MF	0.01	-0.07	a 0.10
MG	-0.03	-0.23	a 0.17
Homogéneo	0.02	-0.07	a 0.12
Nucleolar			
centromérico	0	-0.23	a 0.23
Otros	0.01	-0.13	a 0.16

TABLA 14. Anti-RNP			
Patrón de IF	Índice κ	IC 95%	
Negativo	-0.08	-0.21	a 0.05
MF	0.03	-0.05	a 0.12
MG	-0.03	-0.18	a 0.12
Homogéneo	0.04	-0.04	a 0.13
Nucleolar			
centromérico	-0.02	-0.19	a 0.14
Otros	-0.02	-0.14	a 0.11

6. DISCUSION

En la población estudiada el mayor porcentaje correspondió al género femenino, acorde con el predominio de dicho género en las enfermedades del tejido conectivo como sucede en otras series. La mayor parte de los estudios fueron solicitados para el diagnóstico o seguimiento de una enfermedad reumática (71%), entre ellas, las más frecuentes fueron el lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren y síndrome de superposición. El resto de estudios correspondió a diagnóstico primario no reumatológico dónde por algún motivo se sospechó una etiología autoinmune, las más frecuentes, enfermedades cardiopulmonares como hipertensión arterial pulmonar, derrame pericárdico o tromboembolia pulmonar, seguido de las enfermedades renales como insuficiencia renal crónica o glomerulonefritis.

En el perfil inmunológico, el 12% de las muestras tuvo una prueba de detección de IF-ANA negativa. En los patrones de IF predominó el patrón MF (35%), seguido del homogéneo (30%), siendo el patrón menos frecuente el centromérico (2%). Esto concuerda con los datos reportados por Peene y sus colaboradores donde encontraron los patrones MF (42%) y homogéneo (41%) como los más frecuentes (12). Los títulos más frecuentes en nuestro estudio fueron 1:160 (32%), siendo los títulos más altos (1:5120) y los bajos (1:80) los menos frecuentes representando 5 y 3% respectivamente. El 75% de las muestras tuvo un título \geq 1:160, este título es el nivel que se considera en la mayoría de los estudios un título relevante para el abordaje de la enfermedad del tejido conjuntivo (3, 5, 6).

En relación a las especificidades antigénicas los autoanticuerpos anti-dsDNA fueron los más frecuentes, seguido de los anti-Ro (14%) y anti-RNP (12%). Los anticuerpos anti-La y anti-Sm fueron los menos frecuentes con una distribución similar (5%). Esto difiere con lo reportado en la cohorte de Peene, donde ellos encontraron a los anticuerpos anti-Ro como la especificidad más frecuente (10.5%), seguido de anti-La (6.7%) y anti-dsDNA en solo el 3.2%. La frecuencia de anti-RNP y anti-Sm fue menos frecuente que lo encontrado en este estudio (2.7% y 1.8% respectivamente), en general, para todas las especificidades encontramos una mayor frecuencia en esta población comparado con lo encontrado por Peene y sus colaboradores (12). Estas diferencias pudieran ser explicadas debido a que en nuestra población hay una mayor prevalencia de enfermedades del tejido conjuntivo, principalmente lupus eritematoso sistémico.

Tomando en cuenta el patrón junto con el título por IF-ANA, fue más frecuente el patrón MF a títulos de 1:160, seguido del homogéneo a título de 1:160. Para el patrón nucleolar el título más frecuente fue más elevado (1:640) y aún más elevado para el patrón centromérico (1:2560). Sin embargo, si tomamos en cuenta las pruebas específicas para los autoanticuerpos se puede observar que fue más frecuente encontrar una prueba positiva conforme mayor fuera el título de ANA. Así para los anti-dsDNA el mayor número de casos positivos se encontró a título de 1:12560 (24%), seguido del título 1:640 (18%), encontrando la mayor parte de los casos (65%) a títulos \geq 1:640. Para los anti-Ro, el comportamiento fue similar, teniendo el 22% de las pruebas positivas para esta especificidad a títulos de 1:2560, seguido de 1:640 (19%). El 73% se encontró a títulos

$\geq 1:640$. Los anticuerpos anti-La, RNP y SM se comportaron de manera similar, teniendo el mayor porcentaje de casos positivos a títulos de 1:2560 (26%, 35% y 23% respectivamente) y la mayoría de los casos a títulos $\geq 1:640$ (80%, 74% y 71% respectivamente). Por tanto, para las 5 especificidades estudiadas la mayor probabilidad de encontrar una prueba positiva se encontró a títulos de 1:2560. La mayoría de las pruebas positivas se encontró a títulos de $\geq 1:640$ por lo que podría considerarse éste umbral como el de mayor posibilidad para encontrar una especificidad antigénica positiva. Sin embargo hay que tomar en cuenta que hubo pruebas positivas con ANA negativos para todas las especificidades, en un porcentaje bajo pero considerable (anti-dsDNA 7%, anti-Ro 4.5%, anti-La 5.7%, anti-Sm 4% y anti-RNP 4.5%). En total de las 612 muestras con ANA negativos, el 4.5% tuvo una especificidad positiva. Además, se encontraron pruebas positivas para cada especificidad (anti-dsDNA 35%, anti-Ro el 27%, anti-La 20%, anti-Sm 26% y anti-RNP 29%) a títulos de 1:320 o menores. Por lo que un título alto tiene mayor probabilidad de tener una especificidad positiva pero títulos bajos o ANA negativos no descartan su presencia (3, 5, 6).

Del total de las muestras 31% fue positiva para al menos una especificidad, 14% tuvo una única especificidad positiva (la más frecuente anti-dsDNA 8%, la menos frecuente anti-Sm 0.1%), 8% tuvo 2 especificidades, 3.6% tuvo 3 especificidades, 2.3% tuvo 4 especificidades y solo 1% tuvo las 5 especificidades positivas.

En relación a la congruencia entre los patrones de IF y las especificidades solo se encontró una débil asociación entre el patrón homogéneo/anti-dsDNA y patrón MF/anti-Ro. Ha sido descrito por otros autores que los anticuerpos anti-dsDNA pueden ser observados por IF como un patrón homogéneo nuclear (1, 7, 8, 11). En este estudio encontramos solo una congruencia débil (índice de κ 0.24, IC al 95% 0.16 a 0.32) y se observó que los anti-dsDNA pueden mostrar otros patrones de IF además del homogéneo, principalmente MF que se presentó en el 21%, similar a lo encontrado en la cohorte de Peene, pero también presentando "otros" patrones en el 10% donde se incluyeron patrones como PCNA, NuMA, citoplásmico, anular, entre otros. En menor proporción patrón moteado grueso, centromérico y nucleolar (12).

También se encontró asociación débil entre los anticuerpos anti-Ro y el patrón moteado fino (índice de κ 0.10, IC al 95% 0.02 a 0.18), sin embargo una proporción de pacientes presentó patrón homogéneo (32%), y otros patrones (13%) (12).

Para el resto de las especificidades no se encontró asociación entre el patrón de IF y la especificidad. Para los anticuerpos anti-La se observaron todos los patrones excepto centromérico y moteado grueso. Para los anti-Sm todos los patrones excepto nucleolar y para los anti-RNP se observaron todos los patrones. Esto difiere con algunos de los datos reportados por otros autores. Los anticuerpos anti-Ro y La clásicamente se han asociado con un patrón moteado fino, en este estudio solo encontramos asociación débil de los anti-Ro pero no con anti-La. Los anticuerpos anti-Sm y RNP se han asociado con un patrón moteado (principalmente grueso), en este estudio no encontramos esta asociación incluso el patrón moteado grueso se observó solo en 2.75 de los casos para el RNP y 1% para los anti-Sm, ni siquiera se encontró asociación con el patrón moteado fino y estos anticuerpos pudieron presentar cualquier patrón (1, 7, 8, 11).

7. CONCLUSIONES

En este estudio solo se encontró una congruencia débil entre el patrón homogéneo y los anticuerpos anti-DNA nativo, y en el patrón moteado fino y los anticuerpos anti-Ro/SSA. No se encontró congruencia entre otros patrones de IF y otras especificidades. Con estos datos, por lo tanto, la decisión de la realización de pruebas específicas para determinaciones de autoanticuerpos no debería estar basada en el patrón de IF en la población que acude al INCICh.

Se encontró que una prueba positiva para las especificidades estudiadas fue mas frecuente cuando había títulos elevados de ANA, sin embargo, también se presentaron a títulos bajos o incluso con ANA negativos. En base a esto, la decisión de la determinación de las especificidades antigénicas debe basarse en el contexto clínico del paciente, el grado de sospecha diagnostica y el titulo de ANA. Aunque por otro lado, pudiera ser razonable la determinación de las especificidades inicialmente junto con los ANA basado en el grado de sospecha de la enfermedad especifica, tomando en cuenta que actualmente hay múltiples especificidades disponibles y tanto por cuestiones logísticas como económicas no es posible la determinación de todas ellas.

Se observó que los patrones de IF mas frecuentemente observados (moteado fino y homogéneo) son similares a lo reportado en la literatura para otras poblaciones. En esta población, los autoanticuerpos anti-dsDNA fueron la especificidad mas frecuentemente encontrada, diferente a lo reportado en otras poblaciones, lo que pudiera ser un reflejo de la alta incidencia y prevalencia de lupus eritematoso sistémico en nuestra población.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Lyons R, Narain S, Nichols C, Satoh M, Reeves WH. Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1050:217-28.
2. Habash-Bseiso DE, Yale SH, Glurich I, Goldberg JW. Serologic testing in connective tissue diseases. *Clin Med Res.* 2005 Aug;3(3):190-3.
3. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol.* 2009;4:1.
4. Wiik A FJ. Laboratory tests in rheumatic disorders. In: Hochberg M, editor. *Rheumatology.* 4ta ed. Spain2008. p. 219-32.
5. Stinton LM, Fritzler MJ. A clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. *Autoimmun Rev.* 2007 Nov;7(1):77-84.
6. Hang LM, Nakamura RM. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1997 Jun;34(3):275-311.
7. Muro Y. Antinuclear antibodies. *Autoimmunity.* 2005 Feb;38(1):3-9.
8. Sack U, Knoechner S, Warschkau H, Pigla U, Emmrich F, Kamprad M. Computer-assisted classification of HEp-2 immunofluorescence patterns in autoimmune diagnostics. *Autoimmun Rev.* 2003 Sep;2(5):298-304.
9. Nossent H, Rekvig OP. Antinuclear antibody screening in this new millennium: farewell to the microscope? *Scand J Rheumatol.* 2001;30(3):123-6; discussion 7-8.
10. Damoiseaux JG, Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev.* 2006 Jan;5(1):10-7.
11. Wangel AG, Teppo AM, Pollard A, Howarth S. Antibody profiles of sera giving different nuclear staining patterns. *Scand J Rheumatol.* 1984;13(4):303-9.
12. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis.* 2001 Dec;60(12):1131-6.