



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Péptidos citrulinados cíclicos como prueba diagnóstica para
la detección temprana de artritis idiopática juvenil en
pacientes pediátricos.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
GUZMÁN MORALES ROGELIO**

**Directora de tesis: QFB Elizabeth Guzmán Vázquez
Asesor de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura**

MÉXICO, D.F. 2011





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.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano:

Simplemente y sencillamente porque son lo mejor que podría tener en la vida.....

Gracias por el apoyo incondicional que me brindaron para culminar esta parte de mi vida y sobre todo gracias por el inmenso amor, paciencia y comprensión que tienen hacia nosotros, sus hijos.

LOS AMO!!!!

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, por la oportunidad de darme una formación académica y profesional a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- A mi directora de tesis la QFB Elizabeth Guzmán Vázquez por su apoyo y paciencia no solo en este trabajo sino en todo momento.
- A mi asesor de tesis el Dr. Rubén Marroquín Segura por su disposición y paciencia durante el desarrollo de este trabajo.
- A los profesores Dra. Ma. Isabel Soto Cruz, QFB Ma. del Pilar Cedillo Martínez y M. en C. Ángel García Sánchez por su valioso tiempo otorgado para la revisión y corrección de este trabajo.
- A Ma. Angélica Plaza por su apreciable tiempo durante mi estancia en el Instituto Nacional de Pediatría y por haberme enseñado muchas cosas, tanto académicas como personales.
- A todos mis amigos y compañeros de la carrera por hacer de mi estancia en la FES Zaragoza, la mejor y ayudarme a ser mejor cada día...
- Al Instituto Nacional de Pediatría, INOCHEM y QUIMILAB por brindarme su apoyo tanto en equipos como en reactivos para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
• Artritis Idiopática Juvenil	4
• Epidemiología	5
• Manifestaciones clínicas	5
• Origen de los anticuerpos Anti-Péptido Citrulinados Cíclicos	6
• Relación de anti-CCP y el epítoto compartido en la patogénesis de la AR.....	8
• Métodos Inmunoenzimaticos	11
• ELISA indirecto	13
• ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas)	13
• ELISA “sándwich” (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos)	13
• ELISA competitivo	13
• Consideraciones generales para inmunoensayo ligado a enzima.....	15
• Propiedades Generales de Inmunoglobulinas.....	15
• Inmunoglobulina G (IgG).....	18
• Inmunoglobulina M (IgM)	18
• Inmunoglobulina A (IgA)	18
• Inmunoglobulina D (IgD).....	19
• Inmunoglobulina E (IgE).....	19

• Nefelometría.....	19
Planteamiento del problema.....	22
Objetivos.....	22
Hipótesis	22
Diseño experimental.....	23
Metodología	24
Método	25
Análisis estadístico.....	27
Diagrama de flujo	27
Resultados y análisis de resultados	28
Conclusiones.....	34
Referencias bibliográficas.....	35

RESUMEN

La Artritis Reumatoide (AR) es una de las enfermedades crónicas inflamatorias más comunes afectando entre un 1 y 2% de la población mundial, la forma infantil de la AR es la Artritis Idiopática Juvenil y aunque en nuestro país se desconoce la incidencia y prevalencia de esta, en Europa y América del Norte se ha encontrado incidencia de entre 1 a 22 por 10,000 y prevalencia de 8 hasta 150 por 100,000 habitantes.

El único marcador de laboratorio incluido dentro de los criterios del Colegio Americano de Reumatología es el Factor Reumatoide (FR), pero debido a su baja especificidad se ha buscado el “marcador ideal” capaz de permitir no sólo el diagnóstico precoz de la enfermedad, sino también facilitar el diagnóstico diferencial con otras artropatías inflamatorias e idealmente tener valor pronóstico. Se ha observado que la prueba de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos (anti-CCP) ofrece una gran sensibilidad para este tipo de enfermedades reumáticas, en especial la AR.

En el presente trabajo se determinó la concentración de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos por medio del método de ELISA y se determinó la concentración de Factor Reumatoide mediante el método de Nefelometría en pacientes pediátricos, y por último se realizó una correlación entre ambas pruebas.

Se obtuvo como resultado que el análisis de Péptidos Citrulinados Cíclicos no funciona de igual forma en pacientes pediátricos como en pacientes adultos, ya que al correlacionar esta prueba contra la de Factor reumatoide se obtiene que son directamente proporcionales, lo que significa que mientras una aumenta la otra también aumenta y, cuando una disminuye la otra de igual forma lo hace, por lo que no tiene un valor diagnóstico diferente la prueba de anti-CCP con respecto a la de Factor reumatoide, siendo el resultado de ambas pruebas iguales para el diagnóstico de Artritis Idiopática Juvenil.

INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoide (AR) es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes, afectando en la actualidad entre un 1 y 2% de la población mundial. Esta enfermedad inflamatoria crónica y de carácter sistémico es consecuencia de complejas alteraciones autoinmunes, tanto celulares como humorales, que son las responsables de perpetuar el proceso inflamatorio de la sinovial articular, conduciendo a la destrucción del cartílago y del hueso, y participando, además, en el desarrollo de las diferentes manifestaciones extra articulares de la enfermedad que ensombrecen aún más el pronóstico y la calidad de vida de los afectados, conduciéndolos casi inevitablemente hacia la discapacidad.

En virtud de lo anterior y del alto costo humano y socioeconómico que esta enfermedad implica, son de crucial importancia el diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de esta afección. No obstante, los criterios diagnósticos de uso actual del Colegio Americano de Reumatología (ACR) revisados en 1987 se basan en características clínicas y de imagenología cuya presencia implica la existencia de daño articular previo, imposibilitando entonces la realización de un diagnóstico precoz.

El único marcador de laboratorio incluido dentro de los criterios de la ACR es el Factor Reumatoide (FR), que corresponde a una inmunoglobulina de diversos isotipos (IgM, IgG o IgA) dirigida contra distintos epítopes de la fracción Fc de la Inmunoglobulina G. Si bien el FR posee una gran sensibilidad para el diagnóstico de AR (entre un 65% a 85%) el problema es su baja especificidad (55% a 80%), ya que puede detectarse en otras afecciones inflamatorias agudas y crónicas, de tipo autoinmune o infecciosas, entre otras, e incluso en población sana, principalmente mayores de 55 años.

Basados en lo anterior, un gran número de nuevos anticuerpos se han investigado en un intento por encontrar el "Marcador Ideal" capaz de permitir no sólo el diagnóstico precoz de la enfermedad, sino que también facilitar el diagnóstico diferencial con otras artropatías inflamatorias e idealmente tener valor pronóstico y es aquí donde aparecen los Anticuerpos Anti-Péptido Citrulinado Cíclico (Anti-CCP).

Además se ha demostrado en diversos estudios que la intervención terapéutica temprana reduce la actividad y progresión de la enfermedad. Debido a estos aspectos el diagnóstico temprano de la enfermedad es de gran importancia para conseguir el mayor beneficio terapéutico.

MARCO TEÓRICO

Artritis Idiopática Juvenil

La Artritis Reumatoide (AR) es una de las enfermedades crónicas inflamatorias más comunes, definida tradicionalmente como un desorden inflamatorio crónico, sistémico, de etiología desconocida con principal afectación al tejido sinovial, y tendinoso de las articulaciones.⁽⁸⁾

La forma infantil AR conocida como Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) incluye en su definición a un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas asociadas a artritis y se define como: Aquella que inicia antes de los 16 años de edad, con artritis persistente de una o más articulaciones por al menos 6 semanas, una vez descartadas otras causas. El diagnóstico se basa en la historia clínica, los hallazgos a la exploración y de acuerdo a los criterios diagnósticos de la Liga Internacional de Asociaciones de Reumatología "ILAR" por sus siglas en inglés (tabla1) trabajo multinacional para unificar criterios de los colegios de reumatología más influyentes a nivel internacional.⁽⁹⁾

Tabla 1. CLASIFICACION ILAR DE ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL	
Subtipo	Características Clínicas
De Inicio Sistémico (Fiebre sistémica, Enfermedad de Still)	Artritis asimétrica, fiebre de alto grado en espigas diaria de al menos 2 semanas de duración acompañada de uno ó más de los siguientes; rash evanescente morbidiforme, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y serositis.
Poliarticular Seronegativa	Afecta a 5 o más articulaciones con FR negativo.
Poliarticular Seropositiva	Afecta a 5 o más articulaciones con FR positivo, generalmente simétrica.
Oligoarticular Persistente	Afecta a 4 o menos articulaciones, asimétrica y relacionada a uveítis, Anticuerpos Antinucleares (ANA) positiva.
Oligoarticular Extendida	Afecta a 5 o más articulaciones después de los primeros 6 meses de evolución
Relacionada a Entesitis	Afecta extremidades inferiores. Entesitis, dolor en talón, sacroilitis, úlceras orales, espondilitis anquilosante HLA-B27 positivo, síndrome de Reiter
Psoriásica	Historia personal o familiar de rash psoriático, dactilitis, interfalangicas distales.
Otras (Indiferenciada)	Indiferenciada o que cumple con criterios de más de una clasificación
Modificado de Ravelli A. Martini A. Juvenile Idiopathic Arthritis. In Rich R Clinical Immunology Principles and Practice. 3rd ed. New York: Elsevier; 2008.	

Epidemiología

La AR afecta alrededor de 1-2% de la población mundial.⁽¹⁾ En nuestro medio desconocemos la incidencia y la prevalencia de la AIJ, en Europa y América del Norte se han encontrado incidencia de entre 1 a 22 por 10,000 y prevalencia de 8 hasta 150 por 100,000 habitantes. El subtipo predominante en occidente parece ser la Oligoarticular con variaciones geográficas y étnicas (Oligoarticular 60%, Poliarticular 30% y Sistémica 10%)^(10,11), en una revisión de 109 casos de AIJ en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) se encontró la siguiente distribución; poliarticular 72.5% oligoarticular 19% y sistémicas 8.5%. La AIJ es la enfermedad de etiología autoinmune más común en la infancia, constituyendo alrededor del 65% del total de los padecimientos autoinmunes según el registro de Enfermedades Reumáticas en Pediatría (Tabla 2).

Tabla 2		
Enfermedades Autoinmunitarias en la Infancia		
Enfermedad	Número	Porcentaje
Artritis Idiopática Juvenil	7368	65.2
Lupus Eritematoso Sistémico	1214	10.7
Dermatomiositis Juvenil	658	5.8
Esclerodermia Sistémica	90	0.8
Esclerodermia localizada	340	3.0
Poliarteritis Nodosa	42	0.4
Henoch Schönlein	259	2.3
Kawasaki	838	7.4
Otras Vasculitis	491	4.3

Modificado de: Cassidy JT. Juvenile Idiopathic Arthritis in Harris Kelley's Textbook of Rheumatology. Seventh Edition. New York: Elsevier; 2005. (57,729 diagnósticos de 48,934 pacientes consecutivos del Registro de Enfermedades Reumatológicas en Pediatría de la Base de Datos de Investigación en Reumatología 1999 – 2002)

Manifestaciones clínicas

Artritis Febril Sistémica: la principal manifestación es la fiebre de alto grado (39°C) en espigas que precede la presencia de artritis, exantema morbidiforme evanescente asociado a los picos de fiebre, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, en una minoría de pacientes se puede acompañar de pericarditis o pleuritis ambas leves y asintomáticas. Durante los picos febriles se pueden asociar dolor abdominal y mialgias.

Artritis Oligoarticular: Artritis que afecta a 4 o menos articulaciones, asimétrica, de inicio temprano (antes de los 6 años) asociada a uveítis anterior con Anticuerpos

Antinucleares (ANA) positivo, las articulaciones más afectadas son las rodillas y los tobillos con contracturas articulares.

Artritis Poliarticular Seropositiva: Afecta a más de 5 articulaciones, con FR positivo, usualmente en mujeres adolescentes, con afectación de articulaciones grandes y pequeñas, simétricas y respetando interfalángicas distales, rigidez matutina de articulaciones afectadas, aumento de volumen en varias articulaciones.

Artritis poliarticular seronegativa: Con las mismas manifestaciones que la previa solo con FR negativo.

Artritis Psoriática: Artritis asociada a psoriasis, involucro de articulaciones pequeñas y dactilitis o “dedos en salchicha”.

Artritis relacionada a entesitis: Asociación de entesitis (inflamación tendinosa periarticular) y artritis, la mayoría de los pacientes con HLA-B27, afectando principalmente la inserción del tendón de Aquiles o la fascia plantar y las articulaciones del esqueleto axial.

Artritis indiferenciada: En ésta forma pueden presentarse manifestaciones de varios subtipos o bien, no entrar en ninguna clasificación. ^(10,12)

En Base a lo anterior, un gran número de anticuerpos se han ido investigando tratando de encontrar el “marcador ideal” para poder así no solo utilizarlo como prueba diagnóstica precoz de la enfermedad, sino que también se pueda facilitar el diagnóstico diferencial con otras artropatías inflamatorias, es aquí donde aparecen los Anti-CCP.

Origen de los anticuerpos Anti-Péptido Citrulinados Cíclicos

La historia del desarrollo de los Anti-CCP se remonta a 1964, cuando Nienhuis y Mandena describieron un patrón de inmunofluorescencia perinuclear característico sobre las células de la mucosa bucal de pacientes con AR, designando a esta proteína desconocida como “Factor Perinuclear”, y a los anticuerpos capaces de detectarla, como los anticuerpos anti-factor perinuclear (APF).⁽⁴⁾

Luego, en 1976 Young continuó con esta línea de investigación, describiendo la presencia de un nuevo patrón de fluorescencia, esta vez en relación a los filamentos epiteliales, al enfrentar el suero de pacientes con AR a tejido esofágico de rata,

describiendo los llamados anticuerpos antiqueratina (AKA). Ambos autoanticuerpos demostraron ser muy específicos para AR; sin embargo, su baja sensibilidad (cerca de 50 %) y la falta de estandarización de ambas técnicas contribuyeron para que la determinación de estos autoanticuerpos no se expandiera.⁽³⁻⁵⁾

Posteriormente, en 1995, Sebbag demostró que tanto los APF como los AKA compartían el mismo determinante antigénico que correspondería a una proteína de agregación filamentaria conocida como Filagrina presente en los tejidos epidérmicos, proponiendo entonces el nombre común de anticuerpos anti-filagrina (AFA).⁽⁴⁻⁶⁾

La Filagrina es una proteína agregante de filamentos que participa en la hidratación celular y forma parte del epitelio al asociarse con filamentos de queratina. Es producida durante los últimos estadios de la diferenciación de las células epiteliales y sintetizada como una proteína precursora fosforilada llamada profilagrina, que contiene de 10 a 12 repeticiones de filagrina homólogas, pero no idénticas, las cuales son liberadas por proteólisis durante la diferenciación celular.^(2,4,5,7)

Aun así, el determinante antigénico mayor de los AFA no estaba claramente definido hasta que, en 1998, Schellekens comprobó que los AFA no se dirigían contra toda la molécula completa de filagrina, sino contra ciertos fragmentos específicos caracterizados por la presencia de residuos de citrulina.^(4,5)

La citrulina es una forma modificada de la arginina y corresponde a un aminoácido universal en la economía corporal, pero no tradicional, ya que no se incorpora a la cadena polipeptídica durante el proceso de síntesis, sino que se genera a partir de una modificación postraducciona de la arginina por acción de la enzima peptidil arginina deaminasa (PAD), que convierte la peptidil arginina en peptidil citrulina.⁽⁴⁾

Entonces, el blanco antigénico de todos los autoanticuerpos ya descritos eran estos residuos peptídicos citrulinados, denominándose entonces al conjunto de autoanticuerpos (AKA, APF y AFA) como Anticuerpos Anti-Péptido Cíclico Citrulinado (Anti-CCP), que corresponden actualmente a los autoanticuerpos más específicamente relacionados con AR, de forma que su pesquisa en un título significativo (sobre 200 UI medidos por ELISA) tendría una sensibilidad aproximada del 70% con una especificidad cercana al 98% para AR.⁽⁴⁻⁷⁾

Posteriormente el mismo autor demostró que la citrulinización de los péptidos involucrados era estrictamente necesaria para que las moléculas de filagrina fuesen reconocidas por los Anti-CCP, de forma que al ser expuestos a moléculas no citrulinadas, como la profilagrina, los Anti-CCP no exhibían reactividad, pero sí con la filagrina madura, ya que en este proceso los polipéptidos que forman la profilagrina son desfosforilados y alrededor del 20% de las argininas son citrulinadas por la enzima PAD.^(4,5)

Finalmente, Schellekens estudió mediante técnicas de ELISA los fragmentos citrulinados de la filagrina mediante el uso de motivos comunes o públicos de la molécula, obteniendo en sus ensayos una sensibilidad del 76% con una especificidad del 96% para AR; éstos son los llamados Anti-CCP de primera generación (Anti-CCP1). Posteriormente, mediante la técnica del ciclado, generó bibliotecas de péptidos cíclicos, con lo que mejoró la especificidad de la técnica, llegando a alrededor del 98%, siendo estos anticuerpos de segunda generación (Anti-CCP2) los más utilizados en la actualidad.^(2,4,5)

Relación de anti-CCP y el epítipo compartido en la patogénesis de la AR

La citrulinización es un proceso biológico que involucra la conversión enzimática (desaminación) de los residuos de arginina contenidos en las proteínas, los cambios fisicoquímicos que se producen en estas moléculas, consiste en un pequeño cambio en la masa molecular del péptido y la pérdida de una carga positiva (arginina) hacia una carga neutra (citrulina), pese a lo cual el péptido mantiene sus características polares.

Esta modificación le permite al péptido citrulinado tener una estructura más flexible, dado que carece de ciertas interacciones intramoleculares, de forma que pierde parte de su configuración estructural (se despliega), haciéndose más susceptible al clivaje proteico por otras enzimas que permiten la generación de nuevas interacciones, pero esta vez intermoleculares. Esta nueva estructura del péptido podría ser reconocida como extraña por el sistema inmune cuando es presentada por ciertas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase II, reconocidas por

conferir una mayor susceptibilidad al desarrollo de AR, dado que poseen el llamado “Epítoto Compartido”.

Estas moléculas del MHC clase II, principalmente alelos del HLA DR4, comparten una secuencia aminoacídica conocida como “Epítoto Compartido” (QKRAA, QRRAA o RRRAA) que estaría ubicado en la tercera región hipervariable de la cadena beta de las moléculas DRB1, DR6 y DR10, de modo que las moléculas del HLA que poseen esta secuencia se caracterizan porque uno de sus bolsillos de unión peptídica conocido como P4 adquiere carga positiva, haciendo que los péptidos que poseen arginina no se unan a él, dado que sus cargas se repelen. En cambio, los péptidos citrulinados, que, como ya vimos, poseen carga neutra pero mantienen sus características polares, se unen mucho más eficientemente con moléculas HLA DR4 en comparación con péptidos no citrulinados y de este modo pueden ser presentados a Linfocitos T (LT).

Es aquí donde se ha planteado que los péptidos citrulinados actuarían como potenciales “Péptidos Artritogénicos”, ya que en ciertas condiciones (ambientes pro-inflamatorios) podrían ser reconocidos como extraños por el sistema inmune, de tal forma que estimularía al LT y éste a su vez sería capaz de desencadenar la activación de Linfocitos B (LB) con producción de Anti-CCP dirigidos contra los péptidos citrulinados presentados por la molécula del HLA-II a los LT.

En el otro extremo, encontramos a las moléculas del HLA que carecen del epítoto compartido y se caracterizan porque el bolsillo P4 tiene carga negativa, de forma que la arginina se une eficientemente y al ser presentada a los LT se reconoce como propia, generando la selección negativa de los LT autorreactivos con el consecuente desarrollo de tolerancia periférica y ausencia de autoinmunidad.

Entre los intentos por explicar por qué los péptidos citrulinados actuarían como péptidos artritogénicos se ha planteado que existiría cierto mimetismo molecular entre la secuencia aminoacídica del epítoto compartido(QKRAA) con la glicoproteína número 10 del virus de Epstein-Barr y también con algunas proteínas de choque térmico de la *Escherichia coli*, por lo que esta secuencia le daría a la molécula que la posee la capacidad de presentar antígenos propios como extraños y desencadenar la respuesta inmune que da inicio a la enfermedad.

Pero ¿cómo se produce la citrulinización de péptidos en el espacio articular? Se sabe que para la acción de la enzima PAD son necesarias elevadas concentraciones de calcio intracelular con valores de hasta 100 veces el valor normal de una célula viva, de forma que es frecuente la citrulinización de proteínas en el contexto de procesos inflamatorios donde la presencia de células necróticas y cuerpos apoptóticos permiten elevar los niveles de calcio intracelular con la consecuente activación de PAD, permitiendo entonces la detección de proteínas citrulinadas.

Dentro de las proteínas citrulinadas encontramos a la filagrina, vimentina y la proteína básica de la mielina, siendo muy improbable que alguna de éstas sea el autoantígeno citrulinado específico para AR, debido a que ninguna se encuentra en el tejido sinovial, a menos que éstas llegaran a la articulación en el contexto de un proceso inflamatorio.

Todo lo anterior ha permitido establecer un modelo fisiopatológico del desarrollo de la AR en donde individuos con una predisposición genética para AR sufren procesos inflamatorios de las articulaciones por diferentes motivos (traumático, infeccioso, etc.), lo cual conduce a la llegada de células inflamatorias que contienen enzimas PAD. Una vez en la articulación y finalizado el evento inflamatorio, estas células son eliminadas por apoptosis o removidas por el sistema monocito-macrofágico; no obstante, cuando la apoptosis es masiva o existe un defecto en la eliminación de los detritus celulares podría existir liberación de proteínas citrulinadas y enzimas PAD activas al espacio sinovial capaces de citrulinar otras proteínas de la sinovial como la fibrina y el fibrinógeno, permitiendo la detección de proteínas citrulinadas intraarticulares.

En la mayoría de los casos este proceso sería autolimitado y sin traducción fisiopatológica, pero aquellos sujetos predispuestos en virtud de sus moléculas HLA tipo II serían capaces de presentar estas proteínas citrulinadas a linfocitos T, generando una respuesta aberrante de linfocitos B con producción de autoanticuerpos y complejos inmunes capaces de perpetuar la actividad inflamatoria, convirtiéndose en un proceso inflamatorio crónico que facilitaría el desarrollo de la enfermedad.

En otros casos se ha logrado definir la existencia de un polimorfismo en el gen de la PAD tipo 4 que se caracteriza por la generación de un RNA mensajero de gran estabilidad que da origen a una PAD4 de mayor vida media, capaz de producir grandes

cantidades de proteínas citrulinadas que en pacientes con factores de riesgo (presencia de epítoto compartido) podrían facilitar la síntesis de Anti-CCP y de esta forma iniciar el desarrollo de la enfermedad.⁽¹³⁾

Métodos Inmunoenzimáticos

Los ensayos inmunoenzimáticos fueron desarrollados a mediados de los años sesenta teniendo como base los métodos de inmunofluorescencia, inmunodifusión e inmunoelectroforesis (Nakane y Pierce 1966, 1967; Avrameas y Uriel 1966), posteriormente se observó que los antígenos o los anticuerpos podían ser inmovilizados sobre una fase sólida, lo cual hizo posible la cuantificación de inmunoreactivos en tubos (Engvall y Perlman en Suecia, Van Weemen y Schuurs en Holanda, ambos equipos en 1971), esta técnica permite determinar la concentración de un antígeno o de un anticuerpo mediante la actividad enzimática.⁽¹⁴⁾

Los enzoinmunoanálisis son de dos tipos: homogéneos y heterogéneos. En los primeros no es necesario el paso intermedio de separación o lavado, en los ensayos heterogéneos, generalmente conocidos como enzimas fijadas a inmunoabsorbentes (ELISA), el anticuerpo o el antígeno se liga a una enzima reteniendo el complejo tanto la actividad inmunológica como la enzimática.⁽¹⁵⁾

Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

Los lectores para ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa de ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son las que se

corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los que se utilizan con mayor frecuencia.⁽¹⁶⁾

Estos ensayos se pueden dividir en aquellos en los que se marca el anticuerpo, tales como los ensayos directos, indirectos y del sandwich, y aquellos en los que se marca el antígeno, fijándose el anticuerpo en la fase sólida, tal es el caso del ensayo competitivo.^(17,18)

Las cuatro fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

- Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina). El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competencia de antígeno.
- Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
- Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.
- Revelado de la reacción enzimática. Después de varios lavados para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría.⁽¹⁶⁾

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ej. en el clonaje de anticuerpos monoclonales), o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes.

ELISA indirecto

Se usa para medir niveles de anticuerpo; el antígeno se fija a la fase sólida que reacciona con la muestra donde se encuentra el anticuerpo, tras un lavado se añade inmunoglobulina-anti-globulina humana marcada con una enzima, se vuelve a lavar y se revela. La cantidad de producto formado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.⁽¹⁸⁾

ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas).

Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada.

ELISA “sándwich” (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos).

Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.⁽¹⁶⁾

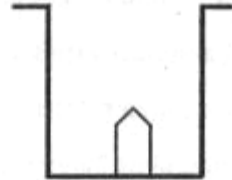
ELISA competitivo

Para medición de antígeno; la muestra se hace competir con antígeno marcado frente a un anticuerpo (unido normalmente a una fase sólida), se lava para eliminar el

componente que ha quedado libre y se revela, la cantidad de producto formado es inversamente proporcional al antígeno (no unido a enzima) existente en la muestra.⁽¹⁸⁾

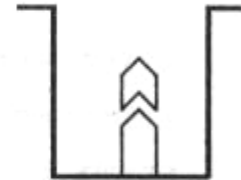
1.- Antígeno absorbido a la placa

LAVAR



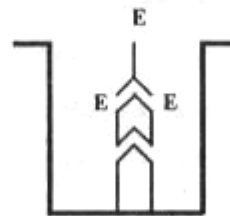
2.- Añadir muestra: anticuerpo específico se une a la placa

LAVAR



3.- Añadir antiglobulina marcada con enzima que se une al anticuerpo

LAVAR



4.- Añadir sustrato



Cantidad hidrolizada = Cantidad de anticuerpos presente

Figura 1. Método indirecto de ELISA en microplacas para la detección y determinación de anticuerpos. ⁽¹⁸⁾

Consideraciones generales para inmunoensayo ligado a enzima

Los inmunoreactivos que se unen a la fase sólida se pueden clasificar en solubles y particulados, dentro del primer grupo se encuentran las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos, y en el segundo grupo por lo general se utilizan las células completas, el método más utilizado para fijar proteínas es la adsorción física directa, cuando esta fijación no es efectiva se procede a inmovilizar la proteína covalentemente mediante la adsorción y fijación posterior por interpolimerización con glutaraldehído o con carbodiimida; los materiales más comúnmente utilizados para la fijación de inmunoreactivos son el poliestireno y el polivinilo, estos materiales se usan en forma de tubos, esferas, placas y varillas. Otros soportes utilizados con buenos resultados son el nylon, la agarosa, el polipropileno, la nitrocelulosa, la celulosa, la goma de silicona y el vidrio.

Después de la etapa de sensibilización de la fase sólida persisten sitios de unión al plástico no ocupados, es necesario bloquear estos sitios con proteínas ajenas al sistema. Para este propósito se puede utilizar albúmina sérica bovina, caseína, suero entero, gelatina, leche en polvo descremada etc. La etapa de lavado es crítica para separar el componente específicamente unido al inmunoreactante inmovilizado en la fase sólida, de componentes que pueden reaccionar en forma no específica. La adición de un detergente no iónico a la solución de lavado funciona adecuadamente, como ejemplo tween 20 en una concentración al 0.05%.

El conjugado se prepara mediante la unión covalente de una enzima o un antígeno o un anticuerpo, esta reacción se lleva a cabo con glutaraldehído, en donde dos moléculas que tengan grupo amino libres pueden unirse con dos grupos carbonilo del glutaraldehído. Esta reacción puede realizarse en una o dos etapas. Las enzimas utilizadas satisfactoriamente son la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la beta galactosidasa y la fosfatasa alcalina.⁽¹⁵⁾

Propiedades Generales de Inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas que elaboran los vertebrados al ser estimulados con un antígeno y que tienen la capacidad para reaccionar

específicamente con el inductor, todas las inmunoglobulinas poseen una estructura común que consiste en dos cadenas polipeptídicas idénticas ligeras (L) (PM aproximado 23,000 Daltons) y dos cadenas polipeptídicas idénticas pesadas (H) (PM aproximado 55,000 a 70,000 Daltons) unidas por puentes disulfuro covalentes. Esto forma una estructura bilateralmente simétrica. Las cadenas H Y L tienen una región terminal-C constante y una región terminal-N variable. Ver figura 2

Las regiones variables se relacionan con la unión al antígeno, en tanto que las constantes se ocupan de varias funciones biológicas, como es la activación del complemento y fijación a receptores de superficie.^(15,18,19)

Las inmunoglobulinas se clasifican con base en su estructura primaria de sus cadenas pesadas. IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, estas difieren en tamaño, carga, composición de aminoácidos y carbohidratos, lo cual puede observarse en el cuadro 1.

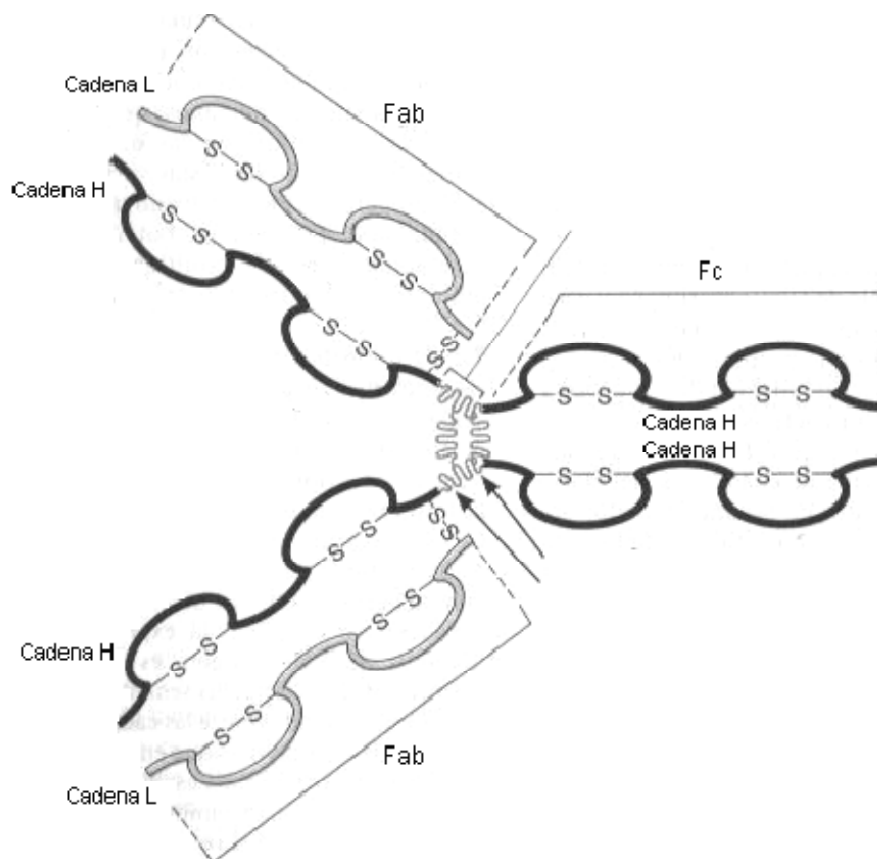


Figura 2. Modelo esquemático de una molécula de anticuerpo humano IgG1 que muestra la estructura básica de 4 cadenas y dominios.⁽¹⁹⁾

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Clase de cadena H	γ	α	μ	δ	ϵ
Subclases de cadena H	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	$\alpha 1, \alpha 2$			
Tipo de cadena L	$\kappa \text{ y } \lambda$	$\kappa \text{ y } \lambda$	$\kappa \text{ y } \lambda$	$\kappa \text{ y } \lambda$	$\kappa \text{ y } \lambda$
Fórmula molecular	$\gamma_2 L_2$	$\alpha_2 L_2$ ó ($\alpha_2 L_2$) CSJ	($\alpha_2 L_2$) J	$\delta_2 L_2$	$\epsilon_2 L_2$
Coefficiente de sedimentación (S)	6 a 7	7	19	7 a 8	8
Peso molecular (aproximado)	150 000	160 000 ó 400 000	900 000	180 000	190 000
Movilidad electroforética (promedio)	γ	De γ rápida a β	De γ rápida a β	γ rápida	γ rápida
Fijación del complemento (clásica)	+	0	++++	0	0
Concentración en suero (aproximada mg/dL)	1000	200	120	3	0.05
Vida media en suero (días)	23	6	5	3	2
Paso a través de placenta	+	0	0	0	0
Desgranulación de células cebadas o basófilos	?	0	0	0	++++
Lisis bacteriana	+	+	+++	?	?
Actividad antiviral	+	+++	+	?	?

Cuadro 1. Propiedades de las inmunoglobulinas humanas.⁽¹⁹⁾

Inmunoglobulina G (IgG)

Esta comprende aproximadamente el 75% de las inmunoglobulinas séricas totales con un peso molecular aproximado de 150,000 Da. Se encuentra distribuida en el líquido extracelular y es la única inmunoglobulina capaz de atravesar la placenta en el humano, siendo la responsable de la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida. La IgG se fija al complemento a través de un receptor FC presente en la región constante de la cadena pesada, la IgG se fija a la superficie de las células y microbios, lo que permite que sean fagocitados o asesinados por células citotóxicas, además fija el complemento del suero y tiene participación en la citotoxicidad natural de células con receptores Fc. Existen cuatro subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, cada una de las cuales con comportamiento diferente ante el complemento.

Inmunoglobulina M (IgM)

Esta constituye aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas totales y presenta una estructura pentamérica, es decir esta formada por cinco unidades básicas idénticas, con un peso molecular alrededor de 900,000 Da. La IgM aparece frecuentemente en etapas tempranas en la respuesta inmune durante procesos infecciosos, también es la inmunoglobulina que se manifiesta sobre la superficie de las células B, en particular los linfocitos B, además es la mejor fijadora del complemento.

Inmunoglobulina A (IgA)

La IgA representa del 15 al 20% del total de las inmunoglobulinas del suero presenta un peso molecular de 400,000 Da para la IgA secretora y de 160,000 Da para la IgA sérica monomérica. En el humano más del 80 % se encuentra como monómero, pero en el suero de muchos mamíferos se presenta como polimérica, comúnmente como dímero. La IgA sérica es una unidad aislada de inmunoglobulina, en tanto que la IgA secretora está constituida por dos unidades conectadas entre sí por una cadena J.

La IgA secretora proporciona el mecanismo de defensa primaria contra las infecciones locales, ya que predomina en secreciones corporales como saliva, calostro, bilis, lagrimas y secreciones respiratorias e intestinales, su función específica es inactivar virus y desarrolla un importante papel en la prevención de las enfermedades alérgicas, al unirse con antígenos que normalmente se ingieren con los alimentos o penetran por vía aérea, como polvo, polen etc.

Inmunoglobulina D (IgD)

Es una unidad monómera con peso molecular de 180,000 Da. Se encuentra en las superficies de los linfocitos B que también tienen IgM, pocas veces se secretan cantidades significativas en condiciones normales y sólo se hallan rastros de ella en la sangre. Es relativamente lábil a la degradación por calor.

Inmunoglobulina E (IgE)

La IgE esta presente en el suero en concentraciones muy bajas (aprox. 0.004%). Con peso molecular aproximado de 190,000 Da. Esta baja concentración se debe a que tan pronto como se produce en las células plasmáticas, su poder citofílico hace que se adhiera a la membrana celular de macrófagos, células cebadas y basófilos. Cuando el antígeno se pone en contacto con la IgE, la célula cebada o el basófilo liberan sustancias mediadoras inflamatorias que originan muchas de las manifestaciones agudas de las enfermedades alérgicas. La IgE participa en los trastornos alérgicos, los valores aumentados de IgE en el suero pueden ser señal de infestación por helmintos.⁽¹⁹⁾

Nefelometría

Cuando la luz atraviesa un medio transparente en el que existe una suspensión de partículas sólidas, se dispersa en todas direcciones y como consecuencia se observa turbia. La turbidez es la propiedad óptica de una muestra que hace que la radiación sea dispersada y absorbida más que transmitida en línea recta a través de la muestra.

La turbidez es ocasionada por la presencia de materia suspendida en un líquido. Hay dos métodos para medir la turbidez de una muestra, la turbidimetría y la nefelometría. La dispersión no supone la pérdida neta de potencia radiante, solo es afectada la dirección de la propagación, porque la intensidad de la radiación es la misma en cualquier ángulo.⁽²⁰⁾

La nefelometría es la medición de la luz que se ha dispersado del rayo principal de una fuente de transmisión luminosa.

La sensibilidad reportada para este método es de $\mu\text{g/ml}$.

Principio:

Se mide la luz dispersada por los complejos antígeno-anticuerpo, que es proporcional a la cantidad de complejos en la muestra.⁽²²⁾

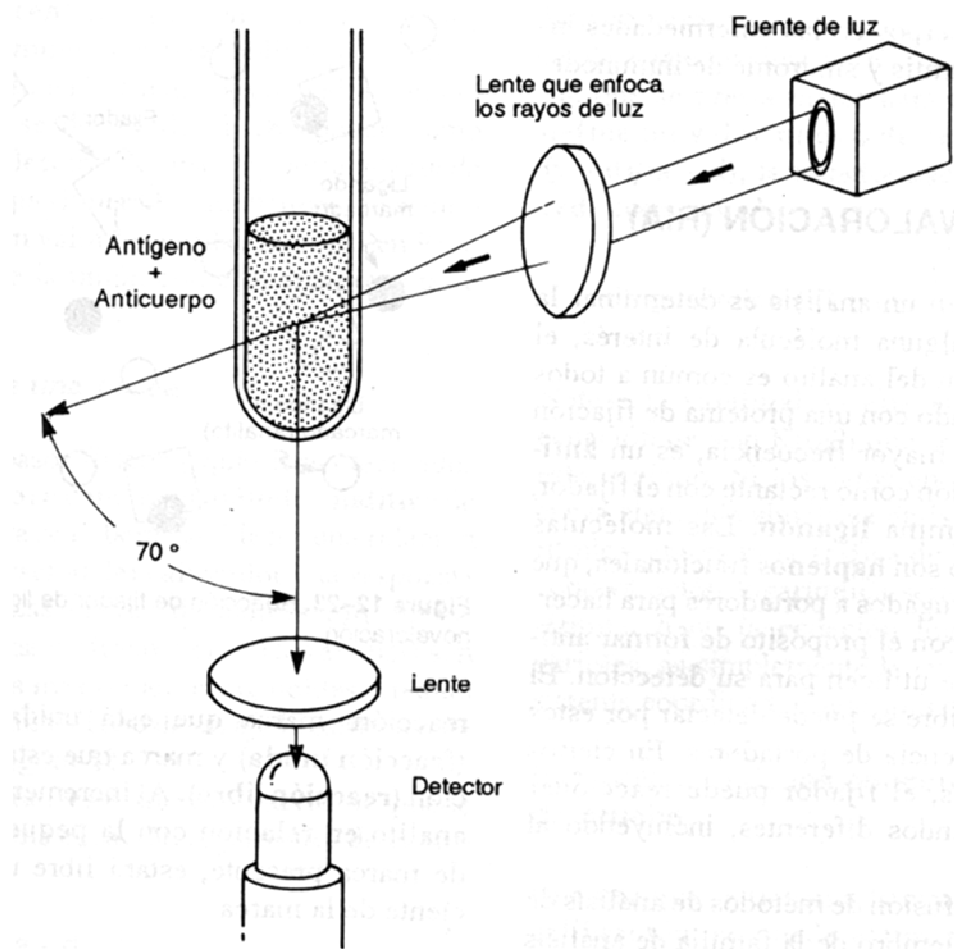


Figura 3. Principio de la Nefelometría.⁽²⁰⁾

La cuantificación se hace por comparación con un estándar de concentración conocida. Cuando moléculas de antígeno y anticuerpo se combinan, los primeros complejos inmunes que se forman son solubles. Si la concentración de los reactivos es baja, no se pueden formar agregados grandes (precipitados). No obstante, es posible determinar qué tanto se forma de complejos pequeños mediante nefelometría. La nefelometría difiere de la colorimetría porque mide la cantidad de luz reflejada en un ángulo con respecto a un haz de luz, en vez de la cantidad de luz absorbida por una solución. La diseminación de la luz aumenta en forma directamente proporcional a la formación del complejo. Esta técnica ha proporcionado un medio rápido y sensible para cuantificar anticuerpos.⁽²¹⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se sabe a través de la literatura, la prueba de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos se ha estudiado últimamente en población adulta y con ello demostrado que sirve muy bien como prueba diagnóstica para la artritis reumatoide, esto debido a su alta especificidad y gran sensibilidad pero, ¿Servirá el estudio de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos como prueba diagnóstica dentro de la población de pacientes pediátricos para la detección temprana de Artritis Idiopática Juvenil?.

OBJETIVOS

General

- Determinar la utilidad de los Péptidos Citrulinados Cíclicos como prueba diagnóstica para la detección temprana de Artritis Idiopática Juvenil en pacientes pediátricos

Específicos

- Determinar la concentración de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos por medio del método de ELISA.
- Determinar si existe correlación entre los estudios de Factor Reumatoide y Péptidos Citrulinados Cíclicos dentro de la población pediátrica.

HIPÓTESIS

Está bien documentado que la prueba de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos en pacientes adultos, sirve como prueba diagnóstica para enfermedades reumáticas, entre ellas Artritis Reumatoide, por lo tanto se espera la misma eficacia de dicha prueba pero ahora aplicada en la población pediátrica con pacientes diagnosticados presuntivamente con Artritis Idiopática Juvenil.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

Estudio de tipo observacional, comparativo, prospectivo y transversal.

Población de estudio

La población utilizada son personas en edad pediátrica

Criterios de inclusión

Personas que se encuentren dentro del rango de edad de 3 a 18 años, no importando sexo, raza, ni estado socioeconómico, incluyendo únicamente a pacientes que presenten un probable diagnóstico de artritis idiopática juvenil y que sean de nacionalidad mexicana.

Criterios de exclusión

Personas que no cumplan con los parámetros establecidos dentro de los criterios de inclusión.

Variables

Se utilizó la técnica de ELISA y de Nefelometría obteniendo como variables los resultados arrojados de las pruebas de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos y de Factor Reumatoide respectivamente.

METODOLOGÍA

Material biológico

- Suero humano

Material Equipos

- Equipo para realizar pruebas mediante la técnica de ELISA; Modelo: Analyzer I de EUROIMMUN
- Equipo para realizar pruebas mediante la técnica Nefelometría; Modelo: BN II de SIEMENS
- Centrifuga clínica
- Congelador American
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo de 13x100 y 12x75
- Gradilla
- Tubos Eppendorf®

Reactivos

Nombre	Proveedor
Kit para pruebas de anti-CCP	EUROIMMUN
Kit para pruebas de Factor Reumatoide	DADE BEHRING

MÉTODO

Se estudiaron 100 sueros de personas pediátricas en un rango de edad entre 3 y 17 años, de nacionalidad mexicana y con presunto diagnóstico de Artritis Idiopática Juvenil. Para cada paciente se registró su nombre, edad, servicio y registro dentro del sistema con el que cuenta el Instituto Nacional de Pediatría.

Una vez obtenidas las 100 muestras se prosiguió a determinarles los anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos mediante el uso de un equipo automatizado para realizar pruebas por la técnica de ELISA y posteriormente la determinación de Factor Reumatoide por una técnica nefelométrica utilizando un equipo automatizado de Nefelometría.

La forma de obtención de las muestras fue mediante punción venosa; una vez obtenida la sangre, se prosiguió a centrifugar 3000rpm durante 5 minutos, se separó el suero del paquete globular y se conservaron los sueros a -18°C . Las muestras de los pacientes fueron recolectadas durante un periodo de 2 meses, para así poder llegar a un total de 100 muestras.

Determinación de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos

Para la determinación de estos anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos se utilizó el equipo para pruebas de ELISA Modelo: Analyzer I de EUROIMMUN.

El kit de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos consta de:

1. Microplaca con 96 pocillos recubiertos con antígenos
2. Calibradores [1, 5, 20, 100, 200 RU/mL (IgG humano)]
3. Control Positivo (IgG humano)
4. Control negativo (IgG humano)
5. Conjugado enzimático (Peroxidasa marcada con anti IgG humano)
6. Buffer de muestra
7. Buffer de lavado
8. Cromógeno
9. Solución de paro

- Técnica de ELISA indirecto
 1. En la placa están adheridos una mezcla de antígenos de Péptidos Citrulinados Cíclicos.
 2. Se hace dilución del suero del paciente 1:100.
 3. Se agrega 100 μ L de la dilución anterior a los pocillos de reacción. No debe de transcurrir mas de 15 minutos durante el pipeteo.
 4. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.
 5. Se realizan tres lavados con 300 μ L de solución buffer de lavado cada uno.
 6. Agregar 100 μ L del conjugado (anti-anticuerpo), en cada pocillo de reacción.
 7. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
 8. Se realizan tres lavados con 300 μ L de solución buffer de lavado cada uno.
 9. Agregar 100 μ L del cromógeno en cada pocillo de reacción
 10. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y proteger de la luz.
 11. Adicionarle a cada pocillo de reacción 100 μ L de la solución paro
 12. Leer la placa en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Determinación de Factor Reumatoide

Para la determinación del Factor reumatoide se utilizó el equipo para pruebas de Nefelometría modelo: BN II de SIEMENS.

El kit de Factor Reumatoide consta de:

1. Reactivo N RF
2. Suplemento N RF

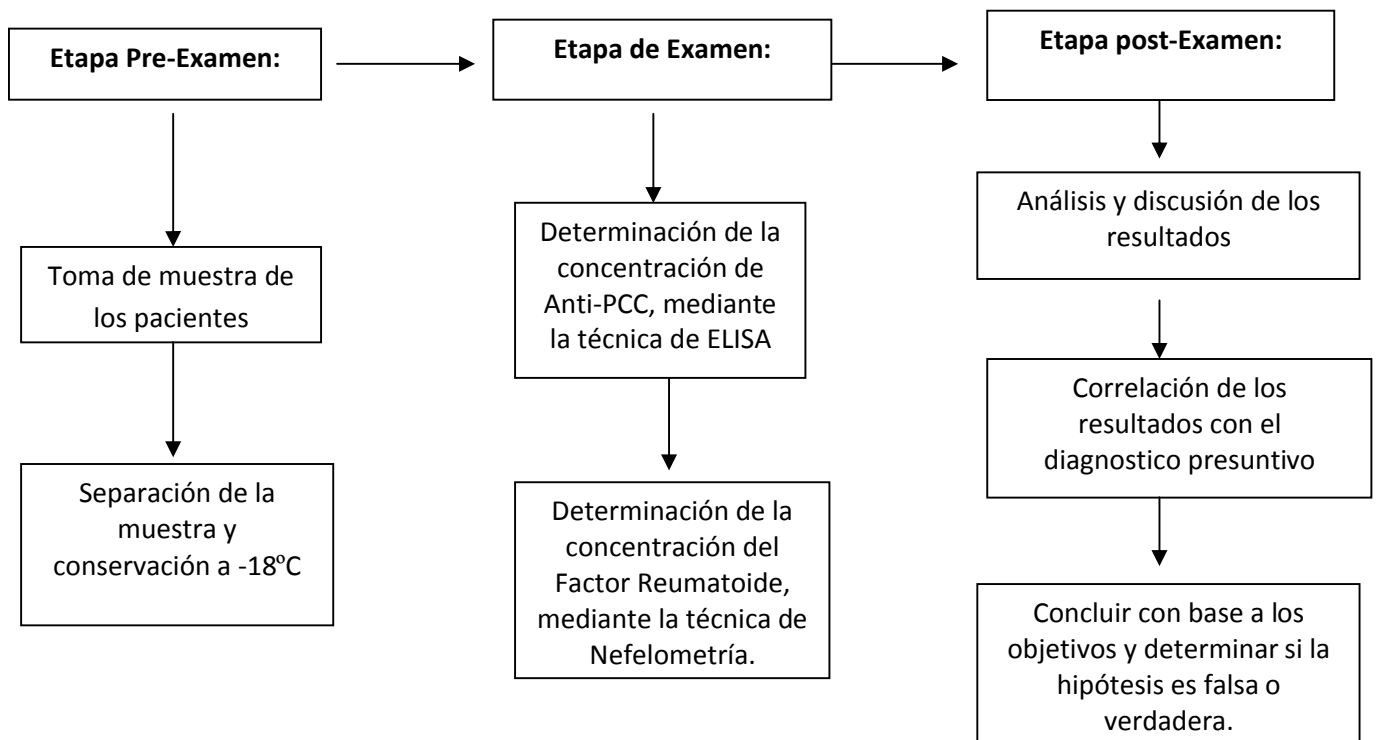
- Técnica de Nefelometría

Se corren los controles y calibradores para así obtener con estos últimos la curva de calibración. Una vez obtenidos los resultados de la luz reflejada de los complejos formados mediante el acoplamiento de antígeno y el anticuerpo del paciente, se extrapola dicho resultado en la curva de calibración y se obtiene el resultado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11.5. Se realizaron correlaciones estadísticas y se realizaron *t* de student (para muestras independientes) ambiente Windows® utilizando una significancia de 0.05.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con la finalidad de determinar si la prueba de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos (anti-CCP) puede ser utilizada como prueba diagnóstica en una población pediátrica se analizaron 100 muestras de pacientes con Artritis Idiopática Juvenil. Para ello se determinó la concentración de dichos anticuerpos mediante la técnica de ELISA y anticuerpos contra el Factor reumatoide mediante la técnica de nefelometría. Haciendo uso del programa estadístico SPSS versión 11.5 se llevó a cabo un análisis de correlación entre la edad y ambos valores de anticuerpos

Correlación entre Edad y Anticuerpos Anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos (anti-CCP)

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
EDAD	11.2200	3.66964	100
ANTICCP	18.0142	51.70981	100

Correlaciones

		EDAD	ANTICCP
EDAD	Correlación de Pearson	1	.191*
	Sig. (unilateral)	.	.029
	N	100	100
ANTICCP	Correlación de Pearson	.191*	1
	Sig. (unilateral)	.029	.
	N	100	100

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

Se obtuvo como resultado una significancia de 0.029 y una correlación de Pearson positiva, lo cual indica que la edad sí influye en el resultado de dicha prueba, por lo que el valor diagnóstico de la prueba aumenta con la edad tal como se ha observado en la población adulta^(23,24).

Correlación entre Edad y Factor Reumatoide (FR)

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
EDAD	11.2200	3.66964	100
FR	65.2110	272.47192	100

Correlaciones

		EDAD	FR
EDAD	Correlación de Pearson	1	.136
	Sig. (unilateral)	.	.089
	N	100	100
FR	Correlación de Pearson	.136	1
	Sig. (unilateral)	.089	.
	N	100	100

En el análisis de correlación entre edad y factor reumatoide se obtuvo como resultado que no hay ninguna correlación entre la edad de los pacientes pediátricos y la positividad de la prueba, ya que se obtuvo una significancia mayor de 0.05, a comparación de lo que se ha reportado en la literatura ⁽²⁵⁾ en la cual la incidencia aumenta con la edad.

Correlación entre Péptidos Citrulinados Cíclicos y Factor Reumatoide

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
FR	65.2110	272.47192	100
ANTICCP	18.0142	51.70981	100

Correlaciones

		FR	ANTICCP
FR	Correlación de Pearson	1	.403**
	Sig. (unilateral)	.	.001
	N	100	100
ANTICCP	Correlación de Pearson	.403**	1
	Sig. (unilateral)	.001	.
	N	100	100

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (unilateral).

Al realizar la correlación entre ambas pruebas en estudio se obtuvo que entre ambas pruebas existe una correlación positiva con alta significancia, lo cual indica que son directamente proporcionales ambas pruebas, por lo que si una aumenta la otra también lo hace y, si una disminuyera de la misma forma lo haría la otra prueba.

Prueba t de Student entre anti-CCP y Sexo

Estadísticos de grupos

SEXO	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media
ANTICCP				
niñas	56	24.6932	61.7746	8.2549
varones	44	9.5136	33.8095	5.0969

Prueba de muestras independientes

	Prueba T para la igualdad de medias			
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias
ANTICCP Se han asumido varianzas iguales	1.466	98	0.146	15.1796
No se han asumido varianzas iguales	1.565	88.481	0.121	15.1796

Prueba t de Student entre Factor Reumatoide y Sexo

Estadísticos de grupos

SEXO	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media
FR				
niñas	56	106.0554	360.0769	48.1173
varones	44	13.2273	12.2795	1.8512

Prueba de muestras independientes

		Prueba T para la igualdad de medias			
		t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias
FR	Se han asumido varianzas iguales	1.707	98	0.091	92.8281
	No se han asumido varianzas iguales	1.928	55.163	0.059	92.8281

Se realizó una prueba t de student para determinar si hay relación entre las pruebas de anticuerpos anti-CCP y factor reumatoide contra el sexo de los pacientes. No se encontró relación alguna, ya que en el análisis estadístico con la prueba *t de student* se obtuvo una significancia mayor a 0.05 lo que nos indica que ambos grupos no muestran diferencia estadística, dando como resultado que tanto la prueba de anti-CCP y Factor Reumatoide no se ven alterados por el sexo del paciente en comparación con la población adulta, donde se ha encontrado una mayor incidencia en las mujeres, debido a que el sexo femenino está mas propenso a dicha enfermedad ⁽²⁵⁾.

Tabla 1 . Resultados positivos para anti-CCP y negativos para FR

Positivos para anti-CCP, negativos para FR		
Paciente No.	Anti-CCP	FR
73	>200	<9.8
80	9.03	<9.8

Tabla 2. Resultados Negativo para anti-CCP y positivo para FR

Negativo para anti-CCP, positivo para FR		
Paciente No.	Anti-CCP	FR
60	<1.0	12.7
61	3.07	25.2
63	2.09	189
64	<1.0	93.3
79	<1.0	18.6
88	<1.0	13.1
97	2.61	20

Como se puede observar en la tabla N°2 la especificidad que posee la prueba de anti-CCP contra el FR, si se altera. Se ha reportado en la literatura ⁽³⁾, que la prueba de factor reumatoide se ve alterada en una gran variedad de enfermedades de tipo autoinmune, en hepatitis, endocarditis, y también en infecciones parasitarias o virales, así como en afecciones inflamatorias agudas y crónicas, a comparación del anti-CCP que es mas específica para enfermedades de tipo reumáticas en especial la AR.

CONCLUSIONES

- Se concluye que el estudio de Péptidos Citrulinados Cíclicos no funciona de igual forma en pacientes pediátricos como en pacientes adultos, ya que al correlacionar esta prueba contra la de Factor reumatoide se obtiene que son directamente proporcionales, esto quiere decir que mientras una aumenta la otra también aumenta y, cuando una disminuye la otra de igual forma lo hace. Por lo tanto no tiene un valor diagnóstico diferente la prueba de anti-CCP con respecto a la de Factor reumatoide, siendo el resultado de ambas pruebas iguales para el diagnóstico de Artritis Idiopática Juvenil.
- Se logró determinar que la edad del paciente pediátrico si influye en el resultado de la prueba de anticuerpos anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos, o sea, a mayor edad el valor diagnóstico de la prueba aumenta, mientras que para la prueba de Factor reumatoide la edad no interfiere.
- Se logró determinar que el sexo de los pacientes pediátricos no interfiere en los resultados de ambas pruebas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A. Bennani, C. Acevedo Alcaraz, A. Pons Castell. Anticuerpos antipéptido citrulinado en el diagnóstico de artritis reumatoide. Asociación española de farmacéuticos analistas 2005;3:54-58.
2. Zedman A, Van Venrooij W, Pruijn G. Use and significance of anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006;45:20-25.
3. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006;65:845-851.
4. Gómez A. Anticuerpos anti-PCC: nuevos autoanticuerpos en la artritis reumatoide. *Revista Española de Reumatología* 2005;32(3):85.
5. Van Venrooij. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:249-253.
6. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A. Rheumatoid arthritis associated auto antibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000;2:236-238.
7. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhausser E. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the chains of fibrin. *Immun* 2001;1166:4177-4179.
8. Cope AP. Rheumatoid Arthritis in Rich R. *Clinical Immunology Principles and Practice*. 3rd ed. New York: Elsevier, 2008.
9. Ravelli A, Martini A. Juvenile Idiopathic Arthritis in Rich R. *Clinical Immunology Principles and Practice*. 3rd ed. New York: Elsevier, 2008.
10. Cassidy J. Juvenile Idiopathic Arthritis in Harris Kelley's *Textbook of Rheumatology*. 7rd ed. New Yorck: Elsevier, 2005.
11. Weiss J, Ilowite N. Juvenile Idiopathic Arthritis in *Rheum. Dis Clin* 2007;33:441-470.
12. Lawrence J. Autoantibody studies in juvenile rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1993;22:265-74.
13. Jadue N. Anticuerpos Anti-Péptido Citrulinado Cíclico en Artritis Reumatoide, Artritis Psoriática y Otras Enfermedades. *Reumatología* 2007;23(4):142-150.
14. Miroslav F. *Handbook of immunochemistry*. Checoslovaquia: Chapman and Hall, 1993:350-356.

15. Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. 5ª. ed. Argentina: Médica Panamericana, 1996:75-129.
16. Rojas EO. Inmunología (de memoria). México: Editorial Panamericana, 1996.
17. Prieto S, Amich S, Salve ML. Laboratorio Clínico. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1993:482-486,498-503.
18. Rose NR. El laboratorio en inmunología clínica. 3ª ed. Buenos aires: Panamericana, 1999:416-428.
19. Stites PD, Terr IA, Parslow GT. Inmunología básica y clínica. 9ª ed. México: El Manual Moderno, 1998:881-882.
20. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. México: Mc Graw Hill, 2000.
21. Abul KC. Inmunología celular y molecular. Madrid: Mc-Graw-Hill, 1995
22. Manual de equipo "BNII Data interface Description for Behring Nephelometer II" version 2.0. Alemania:1998.
23. Vossenaar ER, Van Venrooji WJ. Anti-CCP antibodies, a specific marker for (early) reumatoid arthritis. Clin applied immunol 2004;(4):239-362.
24. Zendman AJ, Vossenaar ER, Van Venrooji WJ. Autoantibodies to citrullinated peptides: a key diagnostic and prognostic marker for rheumatoid arthritis. Autoimmunity 2004;(37):295,299.
25. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. Lancet 2001;(358):903-911.