



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Tinciones atípicas de anticuerpos anti DNA nativo por Inmunofluorescencia y su comparación con el método de ELISA en pacientes

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta:

Gabriela Jessica Rodríguez Alvarez

Q.F.B. Elizabeth Guzmán Vázquez

Directora

M. en E. Yolanda Flores Cabrera

Asesora

México D. F. 30 de Septiembre de 2013.



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.

CONTENIDO

Lista de abreviaturas	1
I. Introducción	2
II. Marco teórico	4
2.1. Autoinmunidad	4
2.2. Lupus Eritematoso Sistémico	5
2.2.1. Defectos genéticos en LES	6
2.2.2. Etiopatogénesis del LES	6
2.2.3. Manifestaciones clínicas	8
2.2.4. Diagnóstico	9
2.2.5. Pronóstico	10
2.3. Anticuerpos anti ADNn	10
2.3.1. Tipos de anticuerpos anti ADNn	11
2.3.2. Origen de los anticuerpos anti ADNn	12
2.3.3. Participación de los anticuerpos anti ADNn en la patogénesis del LES	14
2.4. Métodos de análisis para anticuerpos anti ADNn	16
2.4.1. Radioinmunoensayo	17
2.4.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima	18
2.4.3. Inmunofluorescencia indirecta	19
III. Planteamiento del problema	23
IV. Objetivos	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos particulares	24
V. Hipótesis	25
VI. Diseño experimental	26
6.1. Tipo de estudio	26
6.2. Población de estudio	26
6.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	26
6.4. Variable a medir	27
6.5. Materiales y métodos	28
6.5.1. Materiales	28
6.5.2. Equipos	28
6.5.3. Métodos	29
VII. Resultados	34
VIII. Análisis de resultados	49
IX. Conclusiones	52
X. Anexos	53
XI. Referencias	55

LISTA DE ABREVIATURAS

C1q	Fracción del sistema de complemento
C3	Fracción del sistema de complemento
CA	Célula apoptótica
CD	Célula dendrítica
DNasa	Enzima que cataliza la escisión del Ácido desoxirribonucleico
ADNd	Ácido desoxirribonucleico desnaturalizado o de cadena sencilla
ADNn	Ácido desoxirribonucleico nativo o de cadena doble
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
GMN	Glomerulonefritis
HLA	Antígeno de histocompatibilidad
HLA-DR	Fracción del antígeno de histocompatibilidad
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgG 1, 2, 3, 4	Subclases de Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
LES	Lupus eritematoso sistémico
min.	minutos
PCR	Proteína C reactiva
RIA	Radioinmunoensayo
ARN	Ácido ribonucleico
Ro	Antígeno nuclear Ro

INTRODUCCIÓN

Históricamente, los anticuerpos han jugado un rol importante en el seguimiento de pacientes reumatológicos, también han ayudado a definir las bases inmunopatogénicas de las enfermedades autoinmunes y han permitido clasificar y subclasificar algunas de ellas.

En principio, se sabe que los anticuerpos en las enfermedades autoinmunes reconocen antígenos propios del organismo afectado, lo cual desencadena una serie de respuestas que conducen al daño de órganos y funciones necesarias para la conservación de la salud.

Actualmente se cuenta con varios ensayos inmunológicos, que ofrecen información acerca de la actividad de la enfermedad, compromiso de órganos específicos y pronóstico; estos ensayos se basan principalmente en la detección del anticuerpo presente en el suero del paciente cuando éste tiene la enfermedad; por lo que existen diversos métodos para una variedad de anticuerpos.

Una de las enfermedades autoinmunes por excelencia, es el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), un padecimiento multisistémico causado por mecanismos auto-inmunitarios lesionantes. Tiene una importante mortalidad, pero la mayoría de los pacientes con el tratamiento actual tienen una vida normal. Debido a lo anterior, ha cobrado gran importancia su diagnóstico y seguimiento. La prueba de anticuerpos contra el ácido desoxirribonucleico nativo (anti-ADNn) es la prueba mayormente utilizada, ya que un aumento en su concentración en el suero de pacientes, frecuentemente correlaciona con un aumento en la actividad de la enfermedad y sugiere grave riesgo de daño renal.

Los anticuerpos anti-ADNn se han analizado con varios métodos, como Radioinmunoensayo (RIA), Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) o Inmunofluorescencia Indirecta (IFI); este último, emplea como sustrato el protozoario flagelado *Crithidia luciliae*; y parece tener ganada amplia aceptación a causa de su relativa facilidad; sin embargo, la obtención del resultado, depende de la interpretación de la tinción fluorescente que se hace con base en criterios establecidos; pero, como es de esperarse, existen excepciones, tinciones que no siempre cumplen con las características establecidas y que en principio serían descritas como atípicas, por lo que la interpretación se debe basar en una observación bastante detallada o incluso, la repetición de la prueba. Por otro lado, la escasa información que hay acerca de tinciones atípicas, se centra sólo en aquellos casos en que se tiñen estructuras de la crithidia tales como el flagelo, el cuerpo basal o incluso, el citoplasma, pero no se hace mención de las diferentes tinciones que se pueden encontrar en el cinetoplasto de la crithidia cuando se ensayan las muestras de los pacientes.

Recientemente, se ha mencionado el método de ELISA como alternativa a la IFI, pero la posible desnaturalización parcial del ADNn contenido en los pozos, genera ciertas dudas. Por otro lado, en la IFI, también surgen algunas preguntas sobre si el cinetoplasto contiene únicamente ADNn sin asociación con proteínas nucleares; y más aún, la capacidad de las pruebas de anticuerpos anti-ADNn para predecir la exacerbación de la enfermedad, resulta ser controvertido, pues algunos estudios postulan que el nivel de anticuerpos disminuye en la fase aguda de la reactivación de la enfermedad.

En el presente trabajo, se seleccionó un grupo de muestras provenientes de pacientes pediátricos diagnosticados con LES, a quienes se les practicó la prueba de anticuerpos anti-ADNn por Inmunofluorescencia y mostraron tinciones atípicas. Estas muestras se ensayaron por la técnica de ELISA para la misma prueba, y por medio de un estudio estadístico de concordancia, se evaluó si el resultado obtenido por IFI correlaciona con el que se obtuvo por ELISA para saber si los criterios conocidos son aplicables a este tipo de tinciones, o bien, hay que modificarlos. Además, se revisó el expediente médico de los pacientes para saber el cuadro clínico que presentaban en el momento del análisis y se determinó la correlación entre la detección de anticuerpos anti-ADNn y los periodos de exacerbación de la enfermedad.

MARCO TEÓRICO

Autoinmunidad

La autoinmunidad se define como una respuesta inmunitaria contra un antígeno propio, dañando la salud de quien la padece; es compleja y puede desencadenarse de diversos modos y el riesgo de padecerla depende de una amplia variedad de factores ambientales y genéticos, muchos de los cuales están por identificar. Básicamente se produce por la generación de células, linfocitos T o B que reconocen componentes propios del huésped; y a pesar de haber mecanismos de control o eliminación de estas células, algunas de ellas escapan a dichos mecanismos de tolerancia y son capaces de atacar los tejidos donde se localiza el antígeno para el que son específicos. Existe una característica fundamental que diferencia a las respuestas autoinmunes del resto, y es que, en éstas, generalmente el auto-antígeno persiste y el sistema inmunitario es incapaz de acabar con él. Por ello este tipo de enfermedades suelen ser crónicas y generalmente duran toda la vida. Individualmente la mayoría de las enfermedades autoinmunes son poco frecuentes, pero conjuntamente afectan aproximadamente al 5% de la población de los países occidentales y constituyen el tercer grupo de enfermedades más prevalentes después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.¹

Se conocen factores que participan en el desarrollo de la autoinmunidad. Algunos de éstos son:

- ❖ **Genéticos;** la presencia de ciertos alelos del complejo principal de histocompatibilidad, principalmente del locus HLA-DR predisponen al desarrollo de enfermedades autoinmunes.
- ❖ **Hormonales;** se ha descrito que enfermedades autoinmunes ocurren mayormente en mujeres teniendo inicio, principalmente, en años en que la producción de estrógenos es máxima.
- ❖ **Edad;** los estudios muestran que con el paso de los años, aumenta la predisposición a enfermedades autoinmunes debido a la disminución en la actividad de la células T reguladoras.
- ❖ **Deficiencia de Inmunoglobulina A;** permitiendo el contacto de tejidos con ciertos antígenos que podrían inducir una respuesta contra antígenos propios.
- ❖ **Infecciones virales, bacterianas, fúngicas, etc.,** que producen alteración o colonización de la membrana celular; así como alteraciones del timo, médula ósea y otros tejidos que participan en el desarrollo y activación de la respuesta inmunológica.

- ❖ **Factores ambientales y sustancias químicas** que en condiciones particulares desencadenan reacciones autoinmunes.
- ❖ **Antigenicidad cruzada**; debida a la similitud de moléculas de la membrana celular del huésped con antígenos de microorganismos.
- ❖ **Exposición de antígenos crípticos**; es decir, antígenos que normalmente no entran en contacto con los mecanismos de respuesta inmune debido al sitio en que se encuentran.^{2,3}
- ❖ **Estrés crónico**; debido a la liberación de niveles inadecuados de glucocorticoides (una hormona esteroide), lo que provoca que no se puedan inhibir eficazmente las células que producen inflamación, conduciendo a un estado patológico de la misma.⁴

La clasificación de las enfermedades autoinmunes se basa en los órganos o sistemas involucrados, con lo que se tiene que existen enfermedades autoinmunes órgano-específicas y sistémicas o generalizadas. Las primeras son aquellas en las que el daño se produce en un solo órgano o sistema y son mediadas por anticuerpos y/o células que reaccionan contra antígenos que se expresan específicamente en dichos sitios.

Por otro lado, en las enfermedades sistémicas, los anticuerpos son capaces de reconocer y dañar diferentes componentes celulares o componentes ubicuos presentes en múltiples sistemas, lo que provoca una sintomatología generalizada. La mayor parte del daño en estas enfermedades es causado por los depósitos de complejos inmunes, presencia de auto-anticuerpos, activación de la respuesta inflamatoria aguda y en algunos casos infiltración celular; un claro ejemplo de este tipo de enfermedades es el LES.^{5,6}

Lupus Eritematoso Sistémico

El Lupus Eritematoso Sistémico es una enfermedad heterogénea de carácter autoinmune, su causa se desconoce, afecta de manera predominante a mujeres en edad reproductiva, lesiona varios sistemas del organismo humano, además, se caracteriza por presentar elevados títulos de auto-anticuerpos contra antígenos presentes en los núcleos de las células, principalmente contra el ADNn aunque puede haber anticuerpos contra múltiples antígenos, incluso los que no son ácido nucleico.^{7, 8} Los auto-anticuerpos juegan un rol importante en la patogenia de la enfermedad, generando parte del daño tisular que se observa en los pacientes con LES, ya sea a través de la formación de complejos inmunes o uniéndose directamente a antígenos de superficie. El curso clínico del LES se caracteriza por aumentos de actividad o reactivaciones que tienen características similares a las de la activación inmunológica T dependiente.

Entre los factores fisiopatológicos involucrados en el LES hay características genéticas, ambientales, por ejemplo, agentes infecciosos, drogas y alimentos, así como también se ha observado la acumulación de cantidades anormalmente elevadas de células apoptóticas en los tejidos, lo que indicaría una alteración de los fagocitos para eliminar el material desvitalizado.⁷

Defectos genéticos en LES

La deficiencia del componente C1q del complemento, está asociada con infecciones recurrentes y una prevalencia alta de LES. Efectivamente, la deficiencia de C1q es el defecto genético con más alto riesgo para LES. Experimentalmente, en ratones con una depleción dirigida de C1qa, se observó glomerulonefritis con depósitos de complejos inmunes y células apoptóticas en los glomérulos.⁸

Etiopatogénesis del LES

Una característica del LES, es la formación de auto-anticuerpos. En la actualidad existe creciente evidencia acerca del rol de la apoptosis en la fisiopatología del LES. Cuando una célula activa su programa de apoptosis, las proteínas, las enzimas y el ADN son clivados y fragmentados internamente. Se mantiene la integridad de las membranas, previniendo que se liberen los componentes intracelulares que podrían dañar los tejidos en forma directa o inducir una respuesta inmune. Por otro lado, se ha visto que las células apoptóticas que no son fagocitadas a tiempo pueden entrar en un estado de necrosis secundaria, desintegrándose y liberando su contenido citoplasmático. De esta forma, ganan potencial inflamatorio, lo cual, lleva a la activación de las células B y T autorreactivas con la consecuente producción de auto-anticuerpos característicos del LES, como son los anticuerpos anti ADN de doble hebra y otros antinucleares.

Reportes recientes sugieren un defecto en la eliminación de las células moribundas como un factor importante en la etiopatogénesis del LES. De manera natural, las CA son fagocitadas por macrófagos especializados o menos frecuentemente por células dendríticas inmaduras, o bien, por neutrófilos. Cuando la fagocitosis de las CA por parte de los macrófagos se ve afectada, las células progresan hacia un estado de necrosis secundaria, con acumulación de dichas células. Varios auto-antígenos nucleares son liberados o encerrados en una especie de vesículas que se forman en estas células, llamadas ámpulas, lo cual, las vuelve accesibles para la células dendríticas (CD), las cuales, presentan los antígenos derivados de las CA tardías a los linfocitos T, induciendo la respuesta inmune.^{7, 8}

Existe bastante evidencia para afirmar que las CA no son inmunológicamente neutras, sino que, dependiendo del microambiente en el que el proceso se lleve a cabo, del tipo de célula

presentadora y además de la presencia o ausencia de señales de peligro, éstas son tolerogénicas, es decir, ser procesadas y eliminadas de manera homeostática por el sistema inmune sin provocar daño inmunológico, o, en caso contrario, inmunogénicas, cuando no se da el proceso homeostático y la acumulación de células necróticas son fuente de material antigénico importante.⁷

Hay algunos patrones de reconocimiento moleculares que ayudarían a la diferenciación del material apoptótico del necrótico. Entre ellos encontramos los factores quimiotácticos de fagocitos y otros reguladores que se liberan desde las células en proceso de muerte. Por otra parte, se ha demostrado cómo las CA pueden generar autorreactividad. Experimentalmente, se ha visto que las células T autorreactivas pueden reconocer auto-antígenos modificados y presentados por las CD.^{7, 8}

Experimentalmente, si se administra debris necrótico o apoptótico a ratones normales, en la forma de células fagocíticas cargadas de antígenos, se observa que las CD maduran hacia CD mieloides, pero los macrófagos no montan una respuesta con auto-anticuerpos, ni se observa enfermedad renal.⁷

Por otra parte, la localización conjunta de auto-antígenos con proteínas virales en las ámpulas de CA de queratinocitos infectados puede desafiar la tolerancia a lo propio, de tal manera, que una respuesta inmune que en principio se inicia contra antígenos virales, puede extenderse hacia auto-antígenos conjuntos.⁸

Varios receptores de superficie, así como ciertas moléculas solubles, están involucrados en la eliminación de las CA, las cuales, usualmente, no son pro-inflamatorias. Reportes recientes indican que la opsonización con los factores C3 y C4 del complemento, participan en el de las CA. Los anticuerpos anti-fosfolípido, que frecuentemente, se encuentran en pacientes con LES, son capaces de opsonizar CA y conducir a una respuesta pro-inflamatoria. La fagocitosis de las CA opsonizadas da como resultado una secreción masiva de factor de necrosis tumoral α , lo que aumenta la inmunogenicidad de los antígenos que contienen. Las CD necesitan ser activadas para estimular a las células T. Las células necróticas o infectadas por virus, pero no las CA, se describen como “adyuvantes naturales”. Además, se ha sugerido que células autólogas puestas en estrés, pueden iniciar algunas formas de autoinmunidad. Para estudiar la participación de la presentación del antígeno, se inmunizó a ratones con cantidades aumentadas de CA autólogas. Solamente los ratones a los que se les administraron grandes cantidades de células moribundas, imitando un aclaramiento defectuoso, manifestaron respuesta de los linfocitos T citotóxicos, los cuales, facilitan que los linfocitos B reconozcan los auto-antígenos nucleares y comiencen la secreción de los auto-anticuerpos específicos. Los auto-anticuerpos y los complejos inmunes se depositan en varios órganos causando el daño que se sabe de estas enfermedades.^{7, 8}

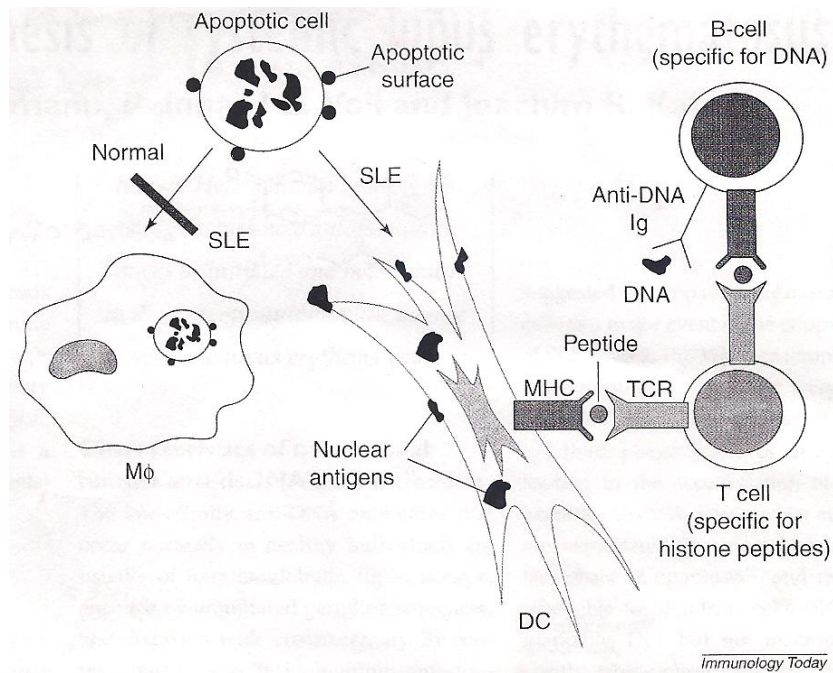


Figura 1. Mecanismo propuesto para la etiopatogénesis del LES. En circunstancias normales, las células apoptóticas son aclaradas por los macrófagos. Así, la presentación de los antígenos a las células T no ocurre. En el LES, las células apoptóticas, no son aclaradas correctamente por los macrófagos y las células dendríticas así como las células B específicas para ADN son dirigidas al contacto con los antígenos derivados de las células moribundas. Los antígenos son presentados a las células T, dando como resultado inflamación y desarrollo de la respuesta inmune.⁸

Manifestaciones clínicas

Desde el punto de vista clínico, el LES es pleomórfico; habitualmente no hay un patrón clínico específico y para establecer el diagnóstico se requiere la participación de estudios complementarios. Las manifestaciones clínicas son muy variadas y pueden presentarse casi todas en un solo paciente, en los diferentes aparatos y sistemas; algunas requieren interrogatorio y exploración intencionados como son la alopecia, el fenómeno de Raynaud, la foto-sensibilidad, las úlceras orales, las adenopatías, etc.

Frecuentemente presentes y muy acentuadas están la fiebre, la pérdida de peso, la astenia o debilidad y la fatiga. La fiebre se presenta en 41 a 86% de los casos en diferentes series de niños y adultos, sin diferencia entre ambos.

Las manifestaciones músculo-esqueléticas son de las más frecuentes, principalmente al inicio del padecimiento; pueden ser muy semejantes a las descritas en artritis reumatoide y ocasionalmente también pueden ser destructivas.

Las manifestaciones cutáneas son las que de hecho, inicialmente, caracterizaron al LES; incluso fueron la causa del nombre descriptivo de este padecimiento. Muy característico es el eritema

malar o en forma de alas de mariposa, sin embargo, las expresiones clínicas cutáneas son tan numerosas y variadas que se emplea una clasificación especial, llamada clasificación de Guillian que puede ser de mucha ayuda en el diagnóstico y clasificación del subtipo de LES.

La afección renal o “nefropatía lúpica” se presenta con frecuencia y es muy importante para el pronóstico del paciente. Su incidencia oscila de 31 a 53% ante la presencia, cuando menos, de alteraciones como proteinuria y sedimento urinario.

El grado de daño renal es importante para decidir la magnitud del tratamiento, el cual, es muy variado y depende también de la valoración particular de los datos clínicos y de laboratorio de cada paciente. Es de mucha ayuda la biopsia renal, con estudios de Inmunofluorescencia y microscopía electrónica.

Existen también, manifestaciones neuropsiquiátricas, cardiovasculares, pulmonares, hematológicas, gastrointestinales y hepáticas, todas con variaciones y diferentes implicaciones para el curso de la enfermedad, algunas de ellas pueden ser coincidentes o secundarias a tratamientos o por circunstancias emocionales relacionadas con el padecimiento crónico.⁶

Diagnóstico

Se basa en los criterios de la Sociedad Americana de Reumatología, con bases clínicas y de laboratorio, pero son muy importantes los estudios de gabinete e histopatológicos. La enorme variedad de posibles manifestaciones clínicas hace difícil el poder emitir un diagnóstico; sólo en una minoría de casos el cuadro clínico es sugestivo de LES, y aún así se requieren estudios complementarios para confirmarlo y es necesario precisar la afectación en los diferentes aparatos y sistemas para tener un pronóstico y decidir el tratamiento.

La dificultad clínica para establecer el diagnóstico hace ver la importancia de los estudios de laboratorio, tanto los generales de los diferentes campos como los inmunitarios. Éstos últimos se pueden considerar como inespecíficos y específicos. Los estudios inmunitarios inespecíficos son los que pueden detectar la presencia de enfermedad auto-inmunitaria, pero no son de alto valor diagnóstico, aunque a veces sugieren la entidad como LES. Los estudios inmunitarios específicos son de alto valor diagnóstico, siempre sobre el contexto del cuadro clínico. Los estudios inmunitarios inespecíficos principales son anticuerpos antinucleares, complemento sérico, anticuerpos contra IgG factor reumatoide, cuantificación de inmunoglobulinas G, M, A y E, cuantificación de proteína C reactiva (PCR) y cuantificación de complejos inmunitarios circulantes. Cuando se tienen anticuerpos antinucleares positivos, complemento bajo, factor reumatoide

positivo, inmunoglobulinas G, M, A o E, PCR y complejos inmunitarios elevados, esto apoya la posibilidad de enfermedad auto-inmunitaria, haciendo más factible el diagnóstico de LES.

Los estudios inmunitarios específicos son muy importantes en LES y los principales son los anticuerpos anti-ADN de doble cadena o nativo, anti-Sm, anti-Ro, anti-La, anti-RNP, anti-cardiolipina y anti- β_2 -glicoproteína I. Se mencionan también, los anticuerpos contra citoplasma de neutrófilos.^{5,6}

Pronóstico

El pronóstico de LES ha mejorado en los últimos 50 años para calidad de vida, grados de invalidez y mortalidad. Considerando la mortalidad, en 1953 se cuantificaba como sobrevida a los 5 años y era de 50%, en 1979, la sobrevida a 5 años era de 88% en los Estados Unidos de América.

En México, en el año 2001 se determinó la sobrevida de 101 pacientes pediátricos: a 5 años de 85% y a 10 años de 82%. Se encontró asociación de mortalidad con afección renal, del sistema nervioso y el empleo de corticosteroides.⁶

Anticuerpos anti-ADNn

Los anticuerpos anti-ADN fueron descritos en 1957; forman parte del repertorio de anticuerpos antinucleares, pueden reaccionar con ADN de una sola cadena o desnaturalizado (ADNd o ADNss), ADN de doble cadena o nativo (ADNn o ADNds) o con ambos. Pueden ser del tipo IgM o alguna de las subclases de la IgG.⁹

Los anticuerpos anti-ADN, son de importancia central en nuestro entendimiento de un mecanismo por el cual los anticuerpos pueden estar relacionados con la patogénesis del LES.¹⁰

Estudios al respecto, comparando niveles de anti-ADN con síntomas clínicos han mostrado que títulos altos de anticuerpo correlacionan estrechamente con el agravamiento o progresión de los síntomas.^{10,11}

Hacia finales de la década de 1950 y comienzos de 1960, se aplicó la técnica de IFI para el análisis de anticuerpos anti-ADN en el LES. Dixon y sus asociados (1958-1961) descubrieron paso a paso los eventos patogénicos de la glomerulonefritis y vasculitis en modelos experimentales de la enfermedad del suero. Cuando analizaron muestras de pacientes con LES, por IFI, encontraron depósitos de gammaglobulina en las asas de capilares glomerulares de riñones enfermos y en los vasos lesionados de otros órganos. Adicionalmente Lachmann (1962) mostró la presencia de C3

junto a depósitos de gammaglobulina; sugiriendo los mecanismos mediados por complejos inmunes importantes en la lesión tisular en el LES.

Sin embargo, es necesario pensar en términos inmunológicos. Títulos persistentemente altos de anticuerpos no siempre se relacionan con depósitos de complejos inmunes, particularmente si circulan anticuerpos en ausencia de antígeno. Bajos títulos de anticuerpos anti-ADN, pueden ser de gran significancia si son debidos a la remoción de anticuerpos por formación de complejos antígeno-anticuerpo y no como resultado de disminución en la producción.¹⁰

En general, cuando estas pruebas para anti-ADN de doble cadena son realizadas a intervalos regulares, independientemente de los síntomas, el aumento de los títulos sugiere que el riesgo de exacerbación de la enfermedad está aumentado por un factor de aproximadamente 2 a 3 en los subsecuentes 3 a 4 meses, mientras que un aumento abrupto es usualmente seguido de exacerbación en unas pocas semanas. Exacerbaciones de glomerulonefritis, vasculitis, o ambas, son las manifestaciones clínicas más frecuentes de estas elevaciones de títulos anti-ADN de doble cadena.^{9, 10}

Es importante mencionar que la presencia de estos anticuerpos se considera como una de las tres alteraciones inmunológicas (las otras alteraciones inmunológicas son anticuerpos anti-Sm y anticuerpos anti-fosfolípido) dentro de los criterios de clasificación utilizados por el Colegio Americano de Reumatología, recordando que un paciente con cuatro de estos 11 criterios puede ser clasificado como un paciente con LES con aproximadamente 95% de especificidad y 85% de sensibilidad.¹⁰

Tipos de anticuerpos anti-ADN

Los tres subgrupos de anticuerpos anti-ADN son:

1. Anticuerpos anti-ADN de doble cadena o bicatenarios sin reacción cruzada con el ADN monocatenario, que reconocen epítopes conformacionales en la doble hélice del ADN. Raros en pacientes con LES.
2. Anticuerpos anti-ADN de doble cadena con reacción cruzada con el ADN de cadena sencilla o anticuerpos anti-ADN nativo dirigidos contra los grupos fosfato desoxirribosa. Presentes en pacientes con LES.
3. Anticuerpos anti-ADN de cadena simple sin reacción cruzada con el ADN bicatenario, que reacciona con bases, mononucleósidos y mononucleótidos. Inespecíficos, no tienen utilidad diagnóstica.¹⁰

Gran parte de la población normal tiene anticuerpos IgM que reaccionan con el ADN, los cuales, forman parte de los anticuerpos naturales y tienen baja afinidad por el ADN y otros antígenos propios, tales como tiroglobulina y miosina.

En cambio, los anticuerpos IgG reaccionan con ADN, tienen menor prevalencia en la población normal, así como alta afinidad y poca reacción cruzada con otros antígenos.

Se sabe que los anticuerpos de tipo IgG fijadores de complemento, poseen valor diagnóstico en aquellos pacientes que se sospecha padecen LES, ya que su presencia frecuentemente se relaciona con la actividad de la enfermedad y el riesgo de glomerulonefritis. Sin embargo, se ha mencionado que algunos anticuerpos de tipo IgM que reaccionan con ADN probablemente también pueden causar daño renal. Otras características que influyen en la patogenicidad de los anticuerpos anti-ADN, incluyen su capacidad para fijar complemento, su afinidad por el ADN, la carga del anticuerpo o del complejo inmune que lo contiene y la secuencia de aminoácidos de las proteínas asociadas.¹²

En cuanto a la forma del ADN de doble cadena; éste se encuentra en forma de hélice, principalmente con plegamiento hacia la derecha, llamada forma B; también se puede encontrar con plegamiento a la izquierda, llamada forma Z. Algunos pacientes con LES tienen anticuerpos contra ambas formas, mientras otros, tienen anticuerpos que reaccionan preferentemente con la forma Z.⁹

Origen de los anticuerpos anti-ADN

Varios mecanismos pueden conducir a la formación de anticuerpos anti-ADN. Como ya se mencionó, algunos de estos anticuerpos forman parte del repertorio normal de auto-anticuerpos naturales. Sin embargo, estos anticuerpos naturales pueden sufrir un cambio de isotipo (de IgM a IgG) lo cual aumenta su potencial patogénico. Además, ciertas mutaciones en los genes que codifican para las inmunoglobulinas pueden conducir a la producción de anticuerpos IgG de alta afinidad contra ADN.

Otra forma en que se han inducido anticuerpos anti-ADN, ha sido en ratones. Por ejemplo, si se les inyecta con ciertas sustancias químicas, como pristano, por estimulación con antígenos, tales como ADN bacterial, fosfolípidos de pared celular de bacterias y virus o por estimulación con complejos de ADN y proteínas. Estos anticuerpos inducidos, pueden depositarse en los glomérulos, donde el daño puede o no puede darse.

Los anticuerpos anti-ADN patogénicos, se pueden inducir más rápidamente, por la inmunización de animales con complejos ADN-proteína. Los antígenos que inician la formación de anticuerpos

anti-ADN potencialmente patogénicos pueden ser: la cromatina o nucleosomas. La evidencia del papel central de la cromatina y los nucleosomas incluyen la presencia de anticuerpos a estas sustancias en el suero de pacientes con LES. Estos nucleosomas, podrían activar a los linfocitos T cooperadores de pacientes con LES, los cuales ayudarían a los linfocitos B a producir anticuerpos anti-ADN de tipo IgG.

La capacidad para formar anticuerpos a cromatina, nucleosomas y ADN depende, en parte, de la predisposición genética. Por ejemplo, en los humanos, una región del cromosoma 1, puede contener un gen o genes portadores de la predisposición para la producción de anticuerpos anti-cromatina y predisponer el LES.

También los complejos ADN-proteína, ARN-proteína, pueden inducir la formación de anticuerpos a ADN. El proceso por el cual la respuesta de los linfocitos T o B a un antígeno, se extiende, para volverse reactivos a antígenos adicionales, depende de la degeneración de los receptores antigénicos de la célula T de tal forma que un solo receptor se une a más de un péptido del complejo HLA. El aumento de la reactividad también depende de la extensión en un determinante; en el cual, las poblaciones de células B o T con diferentes receptores reconocen regiones adicionales en el antígeno iniciador de la respuesta inmune. Estos dos procesos ocurren en las células T humanas in vitro, por lo tanto, las células T o B, inicialmente activadas por un solo antígeno, eventualmente responden a múltiples antígenos propios y no propios.⁹

A través de estos mecanismos, varias exposiciones a antígenos virales, bacterianos o químicos y a antígenos propios (especialmente complejos ácido nucleico-proteína) es que se puede producir la formación de anticuerpos anti-ADN. En las personas genéticamente predispuestas a LES, algunos de los anticuerpos anti-ADN son patogénicos y si la capacidad de regulación de la producción de tales anticuerpos, es defectuosa, la enfermedad se manifiesta. Pero, ¿Cómo los complejos ADN-proteína y ARN-proteína, que debieran ser tolerados por el sistema inmune, pueden volverse inmunogénicos? En células humanas puestas en estrés por ciertas vías, por ejemplo, exposición de queratinocitos a luz ultravioleta, la apoptosis ocurre y las partículas del núcleo y citoplasma son empaquetados en una especie de vesículas de la membrana celular. Algunas de estas vesículas, contienen complejos ARN-proteína, tales como el antígeno Ro (SSA). Quizá el sistema inmune puede reaccionar a estos antígenos cuando son presentados de esta manera o bien, pueden tener lugar los procesos ya descritos en el apartado 2.2.2 del presente marco teórico, donde se habla del rol de la apoptosis en los procesos autoinmunes, básicamente, del LES. Cabe mencionar que también los nucleosomas liberados de células moribundas podrían estimular la producción de anticuerpos a ADN.^{7, 8, 9}

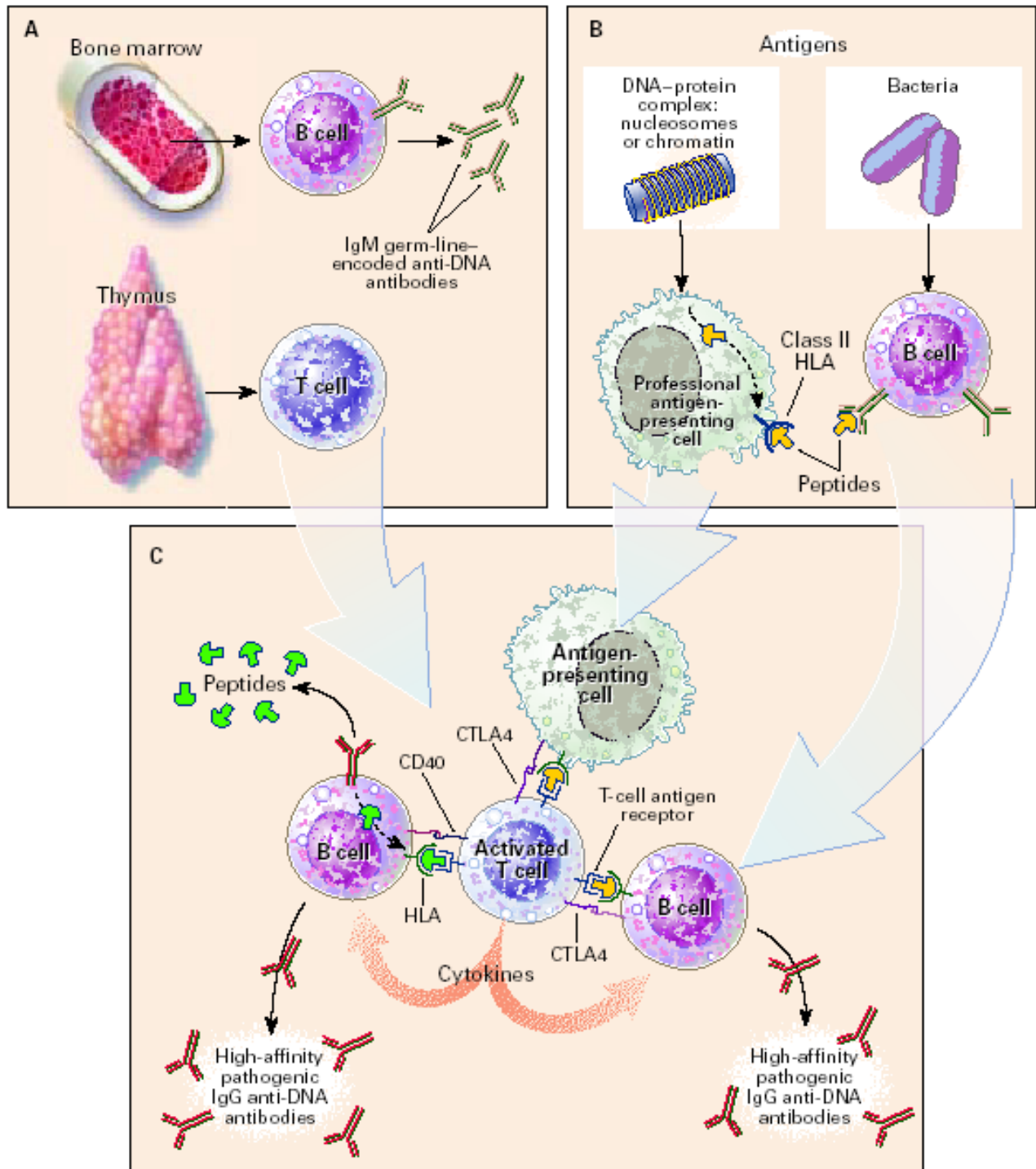


Figura 2. Origen de los anticuerpos anti-ADN. En el cuadro A se muestra una respuesta inmune normal, con células B que secretan anticuerpos IgM de baja afinidad por el ADN, con poca o ninguna participación de las células T. En el cuadro B se muestra la activación del sistema inmune por un antígeno propio y un antígeno ambiental (bacteria). Estos antígenos son captados por las células presentadoras de antígeno o se unen a anticuerpos presentes en la superficie de las células B. Tanto las células presentadoras de antígeno, como las células B procesan los antígenos hacia péptidos y los presentan a las células T con participación del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA). Tales péptidos, también son presentados a través de las inmunoglobulinas de superficie de las células B. Posteriormente, por unión de receptores entre las células presentadoras de antígeno y células B con receptores en las células T, éstas últimas, se activan; se liberan citocinas y por contacto con las células B, estas células T cooperadoras, causan que las células B secreten anticuerpos IgG de alta afinidad por el ADN haciendo probable que se presente la enfermedad autoinmune.⁹

Participación de los anticuerpos anti-ADN en la patogénesis del LES

Varios mecanismos han sido sugeridos para explicar la participación de los anticuerpos anti-ADN en la patogénesis del LES:

Algunos anticuerpos anti-ADN, causan glomerulonefritis por formación de complejos con el ADN, los cuales son atrapados en los glomérulos, mientras que otros causan glomerulonefritis por ataque directo a las estructuras glomerulares. Los anticuerpos anti-ADN han sido eluidos de los glomérulos enfermos y otros tejidos en algunos pacientes con LES, lo que sugiere que estos anticuerpos son causantes del daño tisular. En varios estudios se ha visto que títulos elevados de anticuerpos anti-ADN en el suero, correlacionan con la presencia de LES activo y especialmente con glomerulonefritis. Las muestras de suero de pacientes con glomerulonefritis lúpica (y también las de algunos sin nefritis) contienen inmunoglobulinas que se unen a extractos de membrana basal glomerular humana. El tratamiento de estos extractos con DNasa disminuye mucho esta actividad, lo cual sugiere que los anticuerpos anti-ADN causan nefritis por unirse al ADN situado en componentes de la membrana basal glomerular.

No está claro que características distinguen los anticuerpos anti-ADN patogénicos de los no patogénicos. La fijación del complemento parece ser esencial para causar el daño; así, la IgG1 y la IgG3, las cuales fijan complemento, están aumentadas en los anticuerpos patogénicos. Sin embargo, los anticuerpos IgG2, así como IgG1, IgG3 y anticuerpos IgM a ADN se han encontrado en lesiones glomerulares de pacientes con glomerulonefritis.

Por otro lado, se ha sugerido que una disminución en la capacidad de las células del linaje de los monocitos-macrófagos para captar o fagocitar complejos inmunes que contienen IgG1, IgG2 o IgG3 predispone nefritis. La carga catiónica de un anticuerpo, da ventaja patogénica, probablemente porque el anticuerpo se une a las moléculas cargadas negativamente en la membrana basal glomerular. La alta afinidad hacia el ADN también probablemente da ventajas patogénicas a un anticuerpo, al menos, para inducir glomerulonefritis. Las inmunoglobulinas depositadas en lesiones causadas por lupus, son ricas en idiotipos que están comúnmente presentes en anticuerpos anti-ADN; estos idiotipos pueden servir como marcadores de anticuerpos patogénicos.

La capacidad de los anticuerpos anti-ADN para unirse a otros antígenos en la membrana basal glomerular (tales como C1q o nucleosomas unidos al colágeno tipo IV, por ejemplo) o componentes del tejido glomerular o paredes venosas puede ser un determinante de patogenicidad. Los anticuerpos anti-ADN que se unen a nucleosomas parecen ser particularmente patogénicos, porque pueden unirse al heparán sulfato (proteoglucano que se encuentra asociado a

la superficie celular y a la matriz extracelular de una amplia variedad de células y tejidos) y pueden unirse a nucleosomas atrapados en el colágeno tipo IV en la membrana basal glomerular.

La unión de inmunoglobulinas del suero de pacientes con LES a extractos de membrana basal glomerular se inhibe más efectivamente por nucleosomas que por ADN-libre de proteína.

De esta manera, se puede ver que hay varios mecanismos por los cuales los anticuerpos anti-ADN pueden dañar los glomérulos y probablemente otros tejidos también.⁹

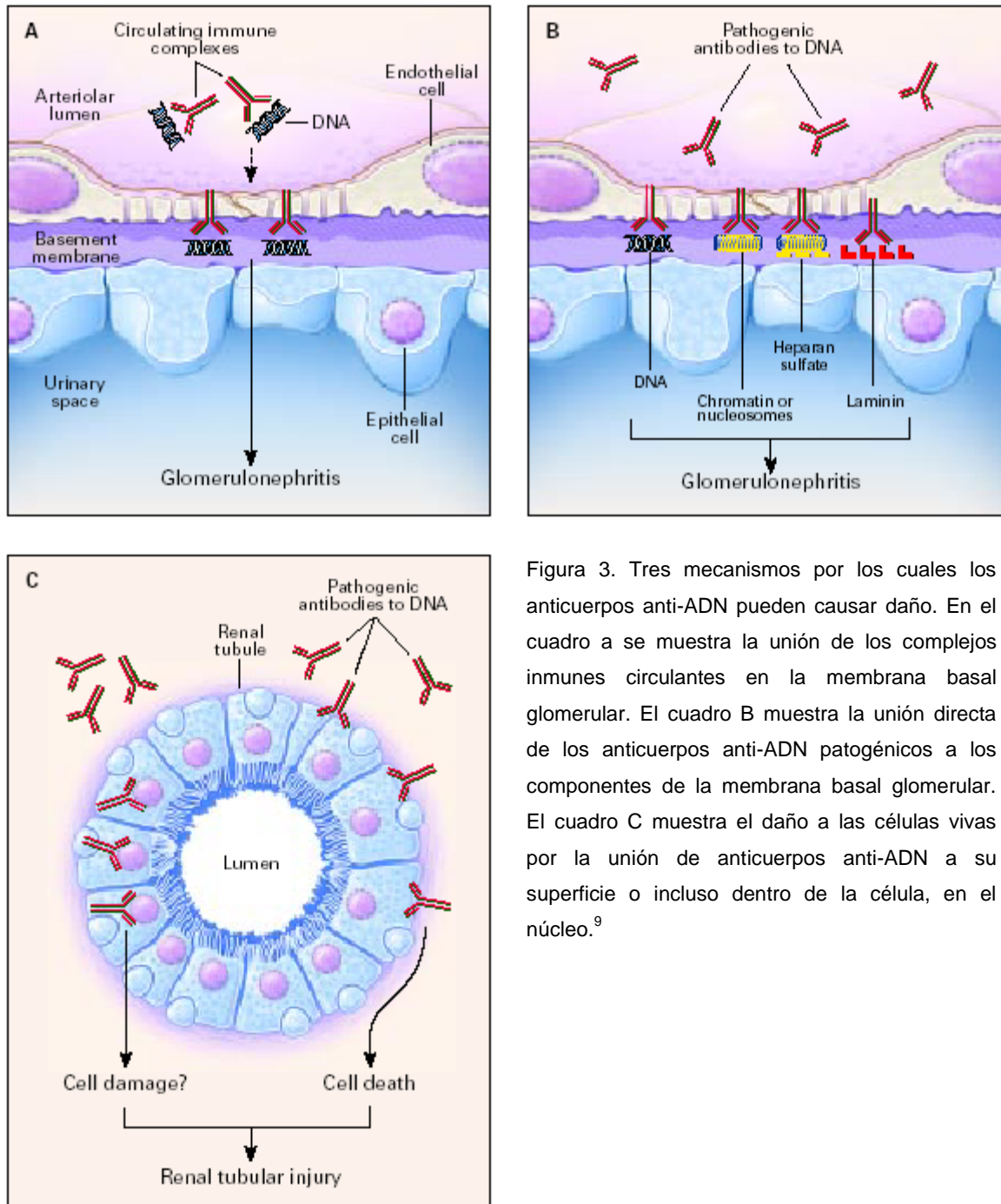


Figura 3. Tres mecanismos por los cuales los anticuerpos anti-ADN pueden causar daño. En el cuadro a se muestra la unión de los complejos inmunes circulantes en la membrana basal glomerular. El cuadro B muestra la unión directa de los anticuerpos anti-ADN patogénicos a los componentes de la membrana basal glomerular. El cuadro C muestra el daño a las células vivas por la unión de anticuerpos anti-ADN a su superficie o incluso dentro de la célula, en el núcleo.⁹

Métodos de análisis para anticuerpos anti-ADNn

Los anticuerpos anti-ADNn son el marcador diagnóstico del LES; del 75 al 95% de los pacientes sin tratamiento y con actividad de la enfermedad, producen estos anticuerpos. Además, son reflejo de la actividad de la enfermedad, sirven para predecir situaciones de exacerbación y son adecuados para el monitoreo de la misma.

Varias técnicas se han desarrollado para medir anticuerpos anti-ADNn; las primeras de ellas, como la precipitación, la hemaglutinación y la fijación de complemento, hoy han quedado en desuso, debido a su poca sensibilidad.¹³ Un repaso de estos métodos se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Métodos para la detección de anticuerpos anti-ADNn.¹⁴

Método	Resumen
Precipitación	Se lleva a cabo por doble difusión en gel de agarosa diluida o por contrainmunolectroforesis. El primer método es de escasa sensibilidad y no es cuantitativo, el segundo, es sensible pero los resultados que se obtienen difieren bastante de los obtenidos por otros métodos.
Hemaglutinación pasiva	El ADN se adsorbe sobre eritrocitos tratados con formalina. El método es sensible pero requiere que los eritrocitos cubiertos sean preparados recientemente; además presenta mucha variabilidad interensayo.
Fijación de complemento	Tiene importancia, desde que se sabe que los anticuerpos fijadores de complemento que se encuentran en el suero de los pacientes, pueden correlacionar con el desarrollo de nefritis lúpica. Sin embargo, no todos los anticuerpos anti-ADNn son fijadores de complemento.

Actualmente, los ensayos más ampliamente usados son la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y Radioinmunoensayo (RIA). Se sabe además de nuevas técnicas como la de microarreglos, que aporta datos acerca de la patogénesis de la enfermedad autoinmune.¹³

Un aspecto importante de todas estas técnicas, es saber las variantes metodológicas de cada una de ellas, así como la sensibilidad y especificidad de las mismas, con el objetivo de elegir la o las técnicas más adecuadas para el análisis del anticuerpo así como mejorar la interpretación de los resultados que proporcione el laboratorio.^{13, 14, 15}

Radioinmunoensayo (RIA)

El ensayo de Farr se basa en la precipitación con sulfato de amonio para separar los complejos ADN/anti-ADN del ADN radiomarcado pero libre en una fase líquida. Este ensayo detecta principalmente anticuerpos de alta afinidad a ADNn, sin distinción de isotipos IgG, IgM. Los complejos ADN/anti-ADN de baja afinidad se disocian debido a la alta concentración de sal.

La elección del antígeno es crítica; el ADN utilizado debe ser mayor de 10^5 pero menor de 10^7 kDalton, de doble cadena y con determinantes antigénicos distribuidos a lo largo de la molécula de ADN.

El ADN circular de doble cadena proveniente de bacteriófago o plásmido y que es fácilmente marcado con ^{125}I después de su extracción, es el preferido para este ensayo. Los niveles de anti-ADN se expresan en IU/mL con base en un estándar de la Organización Mundial de la Salud.

El ensayo de Farr no está libre de falsos positivos que pueden deberse a la precipitación de proteínas como ADNn, protamina y heparán sulfato, entre otras.

Esta prueba se considera el “estándar de oro” para los clínicos, hasta el punto de ser el ensayo más específico para el diagnóstico de LES y su discriminación de entre otras enfermedades autoinmunes pero con el riesgo de estar perdiendo detecciones de LES con anticuerpos de baja afinidad.

En cuanto a la correlación del nivel de anticuerpos con la exacerbación de la enfermedad, hay controversias que sugieren que otros anticuerpos podrían estar participando en la nefritis lúpica, como anti-nucleosomas, anti-ADNn IgM o anti-histonas.

A pesar de todo, la técnica de Farr no es muy preferida ya que el requerimiento de recursos que genera su implementación, como un área especial para su desarrollo, la utilización de sustancias radiactivas con lo que esto conlleva y su alto costo hacen preferibles otras técnicas dependiendo de las capacidades de cada laboratorio.^{13, 15}

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Los ensayos por ELISA se han vuelto los más utilizados en el laboratorio de rutina; tiene sensibilidad y detecta anticuerpos de baja y alta afinidad, principalmente del isotipo IgG pero potencialmente de los isotipos IgM o IgA. Los resultados están estandarizados en IU/mL calibrados con el estándar de referencia internacional de la Organización Mundial de la Salud, además de que el ensayo puede realizarse de manera automatizada.¹³

En el ELISA, básicamente, se utilizan las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar las reacciones inmunológicas. Su capacidad de amplificación hace posible detectar la presencia de una pequeña cantidad de enzima y, como consecuencia, de pequeñas cantidades de los complejos formados. La técnica consiste en fijar el antígeno en placas de poliestireno e incubarlo primero con el suero del paciente; después, con una anti-inmunoglobulina humana marcada con una enzima; posteriormente, se añade el cromógeno-sustrato adecuado y por último, se detiene la reacción por medio de una solución de paro. La reacción se cuantifica con un lector de ELISA.¹⁴

La realización de diferentes estudios, ha dejado ver que hay discrepancias entre los mismos, haciendo notar la posible causa de los resultados discordantes. Las principales dificultades podrían explicarse por: 1) la fuente de obtención del antígeno, en este caso, si el ADNn se obtiene de timo de ternera, de células eucariotas, de bacterias o bacteriófagos o si se fabrica de manera sintética; 2) diferencias en el tamaño y presentación conformacional del epítipo a reaccionar, alteración de la antigenicidad del ADN que pudiese haber ocurrido durante la fijación del antígeno a la fase sólida, rearrreglos conformacionales del ADN, lo cual podría limitar la interacción con el anticuerpo, 3) Sustancias utilizadas como bloqueadores tales como protamina, poli-L-lisina, BSA metilada, pueden provocar la unión de anticuerpos no dirigidos a ADNn; 4) la posible contaminación con ADNd provocaría una sobreestimación de anticuerpos a ADNn, lo cual conduce al reporte de resultados falsos positivos, 5) diferentes características y valores de corte dificultan la estandarización inter e intra-laboratorio. Sin embargo, cierto número de estudios están de acuerdo en que la correlación existe de manera general entre los resultados de diferentes ensayos aplicados a poblaciones y que la discrepancia se presenta en casos particulares de pacientes y que hay gran correlación entre diferentes ensayos, cuando éstos son aplicados a poblaciones de pacientes con LES. Una alternativa al ELISA clásico, es usando ADN biotinilado en una fase líquida y recubriendo vía estreptavidina las placas. Esta metodología, conserva mejor la estructura nativa del antígeno y reduce los cambios conformacionales.^{13, 15}

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) con *Crithidia luciliae*

Esta es una técnica que utiliza al parásito *Crithidia luciliae* para su desarrollo. Este protozoo, contiene ADN circular en forma de hélice contenido dentro del mitocondrion gigante desplazado hacia uno de sus polos, llamado cinetoplasto (ver Anexo 1). Como la crithidia es un organismo procariota, de núcleo pobremente organizado y carente de membrana nuclear, es un sustrato inadecuado para la detección de los anticuerpos antinucleares en su totalidad. Por lo tanto, los anticuerpos anti-ADNn presentes en el suero del paciente reaccionarán únicamente con el cinetoplasto.^{17, 18} La técnica fue descrita inicialmente por Aarden en el año de 1975 y ha probado

ser de gran ayuda tanto diagnóstica, como para el seguimiento de la enfermedad. Aunque ha habido reportes que hablan de que la supuesta presencia de histonas en el cinetoplasto y la presencia de complejos de IgG lipoproteínas en la muestra, pudieran dar resultados falsos positivos, es una técnica que conjuntamente ofrece buena sensibilidad y alta especificidad diagnóstica, motivo por el cual es uno de los métodos preferidos. Este ensayo, es específico para anticuerpos anti-ADNn desde moderada hasta alta afinidad, que permite ensayar isotipos y proporciona resultados confiables, siempre y cuando la técnica se realice siguiendo las buenas prácticas del laboratorio.^{10, 13}

Cabe resaltar que la tinción característica de anticuerpos anti-ADNn, se observa como una tinción anular o total del cinetoplasto y que la tinción de otras estructuras tales como el núcleo, flagelo, citoplasma, corpúsculo basal o membrana de la crithidia no se deben considerar en la interpretación, ya que esto conduce a la emisión de resultados falsos positivos.^{19, 20}

En cuanto a la técnica, ésta se desarrolla de forma manual. Primero, las muestras se incuban con un sustrato de antígenos y posteriormente se lavan para eliminar los anticuerpos que no han reaccionado. El sustrato se incuba con un segundo anticuerpo específico marcado con fluoresceína y posteriormente se lava para eliminar el reactivo que no se ha enlazado. Cuando se observan a través de un microscopio de fluorescencia, las muestras positivas para auto-anticuerpos mostrarán una fluorescencia de color verde manzana en las áreas de la célula donde se ha enlazado el auto-anticuerpo.²⁰

Fundamentos de Fluorescencia

La fluorescencia es el resultado de un proceso en tres etapas que ocurre en algunas moléculas:

1º. Excitación: Se entrega un fotón de energía por una fuente externa a un fluoróforo que absorbe, pasando a un estado electrónico excitado S_1' .

2º. Duración del estado excitado: Existe por un período de tiempo finito (típicamente $1-10 \times 10^{-9}$ segundos), sufre cambios conformacionales y puede interaccionar con su ambiente molecular. Consecuencias: La energía de S_1' es parcialmente disipada produciendo un estado excitado relajado desde el que se emite la fluorescencia; no todas las moléculas inicialmente excitadas del estado 1 vuelven al estado S_0 por fluorescencia, existen otros procesos.

3º. Emisión de fluorescencia: un fotón se emite, lo que permite el retorno al fluoróforo al nivel S_0 . A causa de la disipación de energía durante el estado excitado, la energía de este fotón es menor.

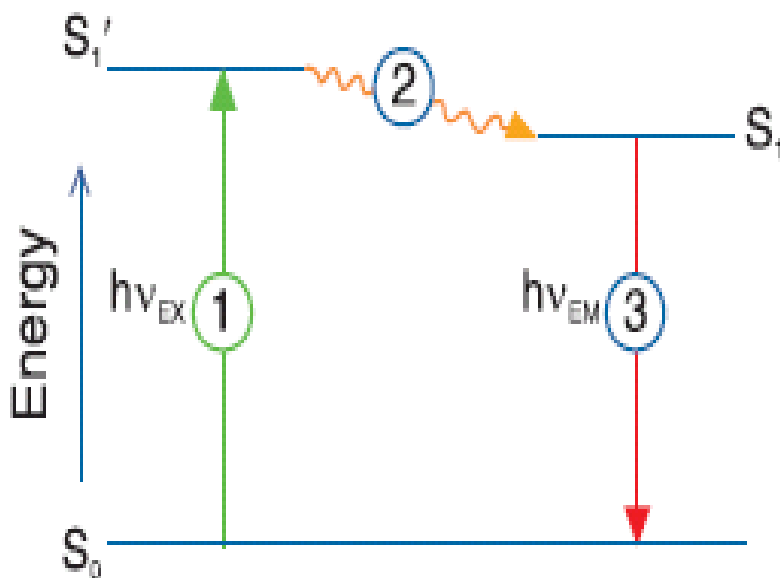


Figura 4. Representación del fenómeno de fluorescencia

Fluoróforos

Generalmente, son compuestos heterocíclicos o hidrocarbónos poli-aromáticos con varios niveles a los cuales pueden ser excitados; y que debido a que son moléculas rígidas, en el retorno a su nivel de energía más bajo, al no rotar, no emiten calor y sí luz.

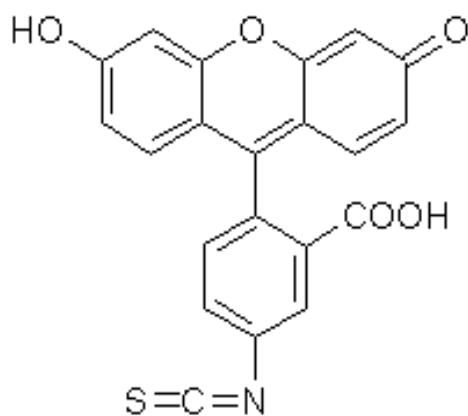


Figura 5. Isotiocianato de fluoresceína

Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característicos; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores).²¹

Microscopía de fluorescencia

La luz de una fuente de longitud de onda múltiple se mueve a través de un filtro excitador que sólo permite que pase la radiación excitada de la longitud de onda deseada. Esta radiación es reflejada por el filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz (por fluorescencia) de una longitud de onda específica y mayor. Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la 0frecuencia de la radiación de excitación.²²

Fuente luminosa: coincidente con espectro de absorción del fluorocromo. Que no llegue al ocular (UV perjudica la retina) Luz monocromática o no.

Filtro excitador: Transparente a λ cortas bloqueando λ más largas.

Filtro de barrera: Transparente a λ largas bloqueando λ cortas. Se coloca entre el objeto y el observador.²²

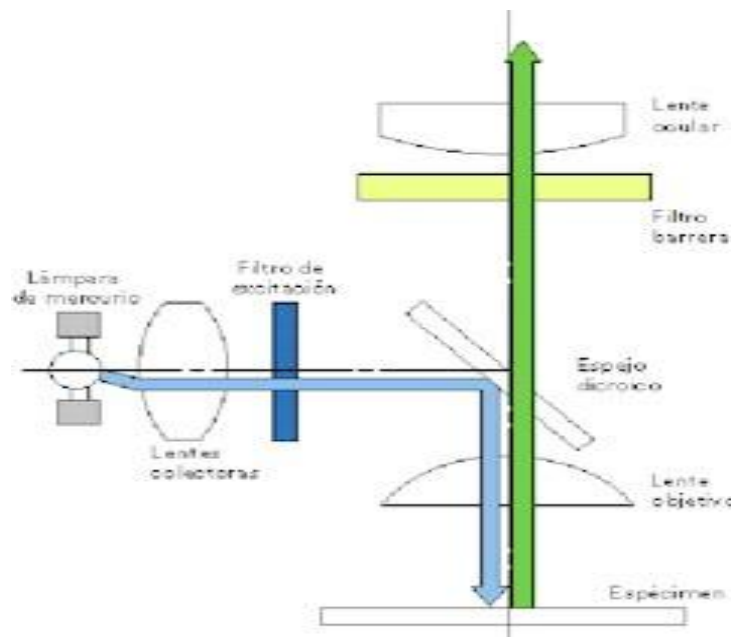


Figura 6. Representación de la microscopía de fluorescencia

Inmunofluorescencia

Consiste en conjugar colorantes fluorescentes con anticuerpos, exponiendo después este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frote de microorganismos o de células, o cultivo de tejidos en capa única. Cuando la reacción es positiva y se expone a la luz ultravioleta se producirá fluorescencia observable bajo el microscopio de inmunofluorescencia.²¹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes es la Inmunofluorescencia indirecta, cuyo objetivo es la detección del anticuerpo presente en el suero del paciente cuando éste tiene la enfermedad. Es una técnica relativamente sencilla donde la etapa final y de mayor importancia es la interpretación de la fluorescencia, la cual se basa en criterios establecidos para traducir la fluorescencia observada como un resultado positivo o negativo. Sin embargo, hay tinciones que podrían considerarse como atípicas, ya que no se observa en ellas la tinción característica del cinetoplasto para un resultado positivo, pero que muestran cierta tinción que hace pensar en el posible reconocimiento del antígeno de interés. Hasta ahora, sólo se ha encontrado información de tinciones atípicas de anticuerpos anti-ADNn, localizada en ciertas estructuras del parásito *Crithidia luciliae*, como el flagelo, el citoplasma o el cuerpo basal y que se ha asociado más bien, a reacciones cruzadas con *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.*, pero no con anticuerpos anti-ADNn.

Se sabe que el estándar de oro para la prueba de anticuerpos anti-ADNn, es el RIA, pero las implicaciones que conlleva la aplicación de un método radiactivo, hace imposible su utilización en el laboratorio. Por otro lado, el ELISA ha proporcionado buenos resultados y elimina la subjetividad del observador. Por lo tanto, se propone utilizar el método de ELISA en aquellas pruebas con resultados atípicos a fin de establecer si hay o no positividad en ellas y a través de un estudio estadístico de concordancia entre métodos, valorar si los criterios de interpretación de la fluorescencia que se utilizan actualmente son adecuados o requieren complementarse con la información que se obtenga de este estudio. Además, se propone buscar la correlación entre la detección de anticuerpos y la presencia de datos de actividad de la enfermedad y de esta manera dar mayor soporte al estudio propuesto.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- ❖ Determinar si los criterios de interpretación de la fluorescencia utilizados actualmente en IFI pueden aplicarse en los casos donde se observan tinciones atípicas para la prueba de anticuerpos anti-ADNn, por medio de un estudio estadístico de concordancia entre IFI y ELISA en un grupo de muestras de pacientes pediátricos con LES, que mostraron este tipo de tinciones.

Objetivos particulares:

- ❖ Analizar por ELISA un grupo de 50 muestras que por IFI mostraron tinciones atípicas y determinar el grado de concordancia entre ambos métodos.
- ❖ Buscar la correlación entre la presencia de anticuerpos anti-ADNn y el daño renal a través de la información del cuadro clínico del paciente en el momento del análisis.
- ❖ Con la información obtenida, analizar y revisar los criterios actuales de interpretación de la tinción fluorescente.

HIPÓTESIS

Siendo la IFI el método de elección para la determinación de anticuerpos anti-ADNn y el ELISA un método cuantitativo que elimina la subjetividad del observador; se podrá hacer, en el caso de tinciones atípicas, una revisión de los criterios de interpretación de la fluorescencia por medio de un estudio estadístico, en el cual, se espera un alto grado de concordancia entre IFI y ELISA.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio:

Transversal, prospectivo, observacional y descriptivo.

Población de estudio:

Pacientes pediátricos que acuden al Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico presuntivo o confirmado de LES, a quienes se les solicita la prueba de anticuerpos anti-ADNn, ya sea para diagnóstico o seguimiento de la enfermedad.

Criterios de inclusión:

Muestras que llegan al laboratorio de Inmunología y Alergia del Instituto Nacional de Pediatría con solicitud de anticuerpos anti-ADNn y que además cumplen con los requisitos establecidos por el laboratorio para la recepción de muestras:

- ✓ En cantidad suficiente.
- ✓ En el contenedor adecuado (tubo de ensaye sin anticoagulante).
- ✓ En el horario de recepción de muestras.
- ✓ Con la solicitud del estudio.

Criterios de exclusión:

Todas las muestras que no cumplan con los criterios de inclusión y/o que presenten alguna de las siguientes circunstancias:

- ✓ Muestras con un alto grado de hemólisis, lipemia o ictericia.
- ✓ Muestras que hayan sido descongeladas más de una vez.

Criterios de eliminación:

Toda muestra que durante su resguardo haya perdido las condiciones de preservación, por alguna de las causas siguientes:

- ✓ Muestras que no sean almacenadas bajo las condiciones especificadas.
- ✓ Ruptura del tubo contenedor.
- ✓ Ruptura del cierre hermético con la posible contaminación de la muestra.
- ✓ Descongelación de la muestra sin ser analizada.

Variable a medir:

Interpretación de la fluorescencia obtenida en la determinación de anticuerpos anti-ADNn.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

- ✓ Material de venopunción Vacutainer® para la toma de muestras (Con tubos de 13X100 sin aditivos, con tapón de cierre hermético y con sistema de vacío para ser utilizados con el sistema Vacutainer®).
- ✓ Toallitas con alcohol isopropílico al 70% de BectonDickinson®, S. A.
- ✓ Tubos de ensaye de vidrio de 13X100 marca Pyrex®.
- ✓ Papel parafilm "M" American National Can®.
- ✓ Tinajas de Coplin de 100mL marca Pyrex®.
- ✓ Pipetas Pasteur Costar® de 5 pulgadas.
- ✓ Pipetas automáticas Finnpiette® de 5-40, 40-200 y 200-1000 µL.
- ✓ Puntas azules para pipeta automática.
- ✓ Puntas amarillas para pipeta automática.
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Kit de Euroimmun® para la determinación de anticuerpos anti-ADNn con *Crithidia luciliae* por Inmunofluorescencia.
- ✓ Kit de Euroimmun® para la determinación de anticuerpos anti-ADNn por ELISA.

Equipos:

- ✓ Microscopio de fluorescencia Eurostar II de Euroimmun®.
- ✓ Equipo automatizado Analyser I® para la determinación de ELISA.
- ✓ Ultra congelador REVCO® de -70° C.
- ✓ Congelador American® de -20° C.
- ✓ Centrífuga GS-GKR Beckman®.
- ✓ Mezclador Vortex Shelton Scientific®.

- ✓ Placa de agitación Solbat®.
- ✓ Agitadores magnéticos de aproximadamente 4 cm y 1 cm de longitud.

Métodos:

Recolección de muestra, procesamiento y conservación.

1. Recibir las muestras que llegan al laboratorio para análisis de anticuerpos anti-ADNn y que cumplen con los criterios de inclusión establecidos.
2. Dejar coagular las muestras por espacio aproximado de 30 minutos (min.) a temperatura ambiente y en posición vertical. Los tubos deberán conservar su cierre hermético durante este proceso y en el de centrifugación.
3. Centrifugar las muestras a 2500 rpm, durante 10 min.
4. Separar el suero en un tubo de vidrio de 13X100, etiquetarlo y taparlo con papel parafilm.
5. Almacenar el suero a -20° C hasta por 1 semana.
6. Analizar las muestras resguardadas por el método de IFI descrito más adelante, para detección de anticuerpos anti-ADNn.
7. Seleccionar las muestras que presentan tinciones atípicas del cinetoplasto, es decir, tinciones que no estén descritas en los criterios de interpretación conocidos.
8. Almacenar estas muestras en un ultra congelador REVCO a -70°C, hasta el momento de su análisis por la técnica de ELISA.
9. Seleccionar 8 muestras francamente positivas a anticuerpos anti-ADNn y 8 muestras negativas y almacenar como en el paso 8.
10. Analizar las muestras seleccionadas por el método de ELISA, de acuerdo al procedimiento que se describe más adelante, considerando controles positivos, negativos y calibradores.
11. Aplicar prueba estadística de Cohen a los resultados obtenidos.
12. Revisar los expedientes clínicos de los pacientes en la fecha que se les tomó la muestra y ver si hay presencia de actividad de la enfermedad.
13. Analizar resultados y concluir.

Inmunofluorescencia Indirecta

1. Antes de utilizar cualquier reactivo, dejar que éste alcance la temperatura ambiente por espacio de 15 min. Las laminillas con la preparación de *Crithidia luciliae*, deberán también atemperarse por alrededor de 15 min. pero evitar mayor tiempo para la conservación del sustrato. Los reactivos que no han de utilizarse en el momento, deberán mantenerse a una temperatura entre 2 y 8°C.
2. Disolver la sal de amortiguador de fosfatos proporcionada en el kit de Euroimmun®, en un litro de agua destilada y agregar el contenido del vial de Tween 20®. Esta solución una vez preparada puede almacenarse hasta 1 semana entre 2 y 8° C.
3. Las muestras de los pacientes a analizar por IFI, se almacenan por 1 semana a -20° C.
4. Previo al análisis, las muestras se diluyen con el amortiguador de fosfatos, 1:10, por ejemplo, diluyendo 50 µL de suero con 450 µL de amortiguador de fosfatos.
5. Aplicar 25 µL de muestra diluida en cada área de reacción, en la placa de reacción, evitando la formación de burbujas. Colocar todas las muestras a ensayar, antes de empezar la incubación.
6. Colocar las laminillas con el sustrato, de manera adecuada en la placa de reacción. Asegurarse de que todas las muestras están en contacto con su sustrato correspondiente en el biochip. Incubar por espacio de 30 min. a temperatura ambiente (18 a 25° C).
7. Tras la incubación, lavar suavemente el suero con el amortiguador de fosfatos con ayuda de una piseta. Orientar el portaobjetos y el chorro de amortiguador de forma que se evite que la solución pase por encima de varios biochips a la vez. También se debe evitar dirigir el chorro directamente sobre los biochips para que no se dañe el sustrato y no se debe permitir que el sustrato se seque durante el procedimiento del ensayo.
8. Inmediatamente, sumergir las laminillas en una tina de Coplin con amortiguador por lo menos 5 min. con agitación constante.
9. Atemperar el vial de anticuerpo conjugado, protegiéndolo de la luz solar directa y colocar 20 µL en cada área de reacción de la placa de reacción.
10. Sacar una laminilla de la tina Coplin y rápidamente secar el exceso de amortiguador y colocar de nuevo en la placa de reacción. Verificar que cada biochip esté en contacto

con el líquido correspondiente. Hacer lo mismo con el resto de las laminillas y de aquí en adelante, protegerlas de la luz solar directa. Incubar por 30 min.

11. Lavar la laminillas como en los pasos 7 y 8, protegiendo las laminillas de la luz solar directa.
12. Colocar un cubreobjetos en los espacios señalados en la base de unisel que acompaña a la placa de reacción y adicionar 1 gota de medio de montaje en cada lugar correspondiente. Sacar una laminilla, secar el exceso de amortiguador perfectamente y colocarla en contacto con el medio de montaje y su cubreobjetos cuidadosamente.
13. Leer en el microscopio de fluorescencia Eurostar II®.

Ver resumen de la técnica en el Anexo 2.

Interpretación de la fluorescencia

Para interpretar correctamente los resultados hay que reconocer claramente las diversas características morfológicas del microorganismo *Crithidia luciliae*.

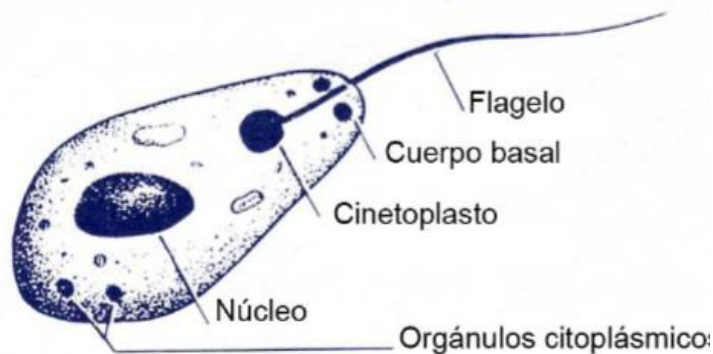


Figura 7. Estructura de *Crithidia luciliae*.

Aunque por lo general el cinetoplasto se localiza más cerca del cuerpo basal que el núcleo, la localización exacta de este orgánulo puede variar de unas células a otras. Para distinguir claramente el cinetoplasto del núcleo hay que observar el pozo de control positivo. El cinetoplasto siempre estará más cerca del flagelo (ilustración anterior). El cinetoplasto no se tiñe en el pozo de control negativo, pero sí en el positivo.

Sólo se debe analizar un microorganismo bien definido por campo. La morfología de los microorganismos puede variar debido a la fijación durante la fase de crecimiento logarítmico.

Reacción negativa: Una muestra se considera negativa si no hay tinción específica del cinetoplasto. La tinción de otras estructuras, como el cuerpo basal, el flagelo o el núcleo sin tinción concomitante del cinetoplasto debe considerarse como negativa para la reactividad de ADNn.

Reacción positiva: Una muestra se considera positiva si se observa una tinción específica del cinetoplasto, independientemente de la tinción de otras estructuras como el núcleo.^{19, 20}

Intensidad de la fluorescencia

Es posible semicuantificar la intensidad de la fluorescencia con arreglo a las directrices sobre reactivos con anticuerpos fluorescentes establecidas por los Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC). Ponderar la intensidad de la tinción de acuerdo a los criterios establecidos en el cuadro 2:

Cuadro 2. Criterios para la interpretación de la fluorescencia.^{23, 24}

Resultado	Criterio aplicado en base a la intensidad de la tinción
1 +	La menor fluorescencia específica verde manzana que permite diferenciar claramente un cinetoplasto de la fluorescencia de fondo.
2 +	Fluorescencia moderada claramente visible color verde manzana.
3 +	Fluorescencia brillante color verde manzana.
4 +	Fluorescencia resplandeciente color verde manzana

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)

1. Dejar que los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente por espacio de 30min.
2. Preparar el amortiguador como lo indica el instructivo.
3. Proteger el cromógeno de la luz en todo momento.
4. Diluir las muestras de suero 1:201. Diluir 5 µL de suero en 1 mL de amortiguador sample buffer y mezclar bien en Vortex.
5. Colocar 100 µL de calibradores, controles positivo y negativo y las muestras diluidas de pacientes en cada pozo de la microplaca de acuerdo al protocolo de pipeteo e incubar por 30 min. a temperatura ambiente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 1	P4	P12									
B	C 2	P5	P13									
C	C 3	P6	P14									
D	pos.	P7										
E	neg.	P8										
F	P 1	P9										
G	P 2	P10										
H	P 3	P11										

Figura 8. Protocolo de pipeteo para la placa de ELISA:

6. Lavar vaciando el contenido de los pozos, adicionar 300 μ L de amortiguador de lavado en cada pozo, mezclar suavemente y vaciar nuevamente el contenido de la placa. Repetir dos lavados más.
7. Adicionar 100 μ L de anticuerpo conjugado con enzima a cada pozo e incubar por 30 min. a temperatura ambiente.
8. Lavar la placa, como se describe en el paso 6.
9. Colocar 100 μ L de solución cromógeno-sustrato dentro de cada pozo de la microplaca. Incubar por espacio de 15 min. a temperatura ambiente y protegiendo de la luz solar directa.
10. Adicionar 100 μ L de solución de paro a cada pozo de la microplaca en el mismo orden y a la misma velocidad en que se adicionó la solución cromógeno-sustrato.
11. Leer la placa en el equipo

Cálculo de resultados

Con los valores de absorbancia medidos en los calibradores y las unidades de concentración correspondientes, se traza una curva de calibración. Para calcular el resultado de la muestra analizada, se interpola la absorbancia obtenida de la misma y se calcula el resultado correspondiente en UI/mL.

Interpretación de resultados.

El límite superior (cut-off) de anticuerpos anti-ADNn recomendado por Euroimmun es 100 UI/ml. La recomendación es interpretar los resultados de la siguiente manera:

< 100 UI/mL : negativo

\geq 100 UI/mL : positivo

RESULTADOS

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos, primero se seleccionaron muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo o confirmado de LES que por IFI mostraron tinción atípica. Se logró recolectar 50 muestras de pacientes (8 del sexo masculino, 42 del sexo femenino, con rango de edad de 4-19 años y media de 13). Posteriormente, las muestras fueron analizadas por el método de ELISA. También se obtuvo información de si el paciente tuvo datos de actividad de la enfermedad en el momento que se le tomó la muestra con el fin de relacionar dicha actividad con el nivel de anticuerpos. A continuación, se presentan los resultados obtenidos por ambos métodos. Primero, se presentan algunos ejemplos de las tinciones observadas en IFI; después, la curva de calibración obtenida por el método de ELISA, a partir de la cual se calculan los resultados y finalmente, una tabla con los resultados obtenidos por ambos métodos y la información de si el paciente tuvo datos de actividad de LES en el momento del estudio.

Resultados obtenidos por IFI.

A continuación, se presentan algunos ejemplos representativos de las tinciones observadas en este estudio.

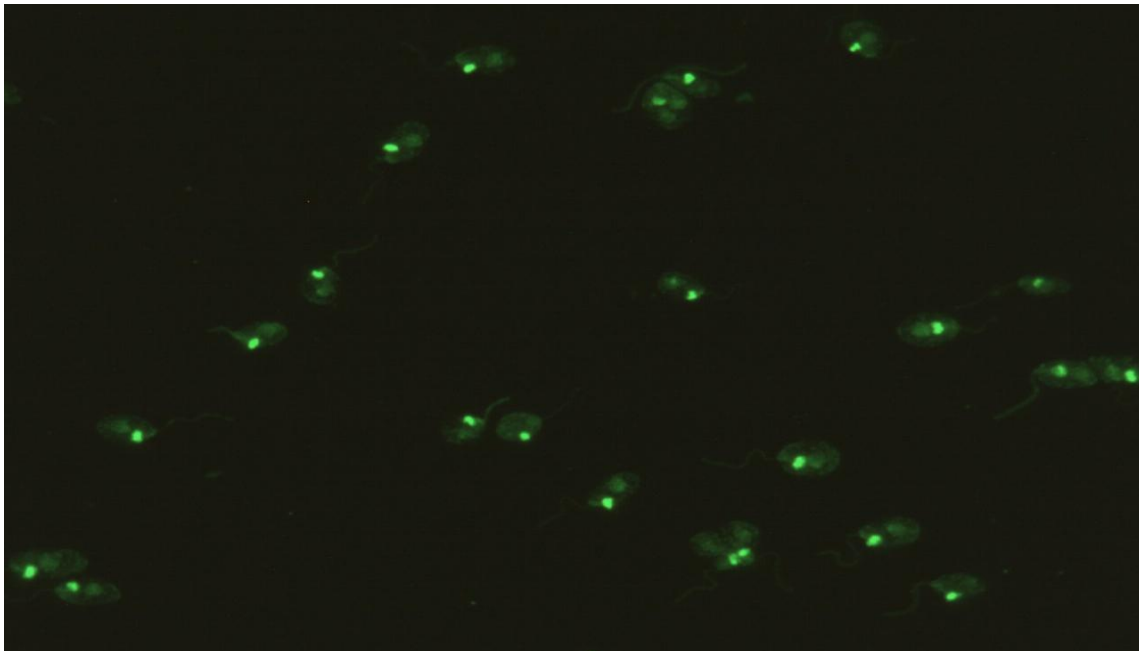


Figura 9. Tinción de un control positivo para la detección de anticuerpos anti-ADNn por IFI. Se debe observar fluorescencia verde manzana en todo el cinetoplasto, el cual, está ubicado en la parte inferior del parásito y orientado hacia un lado del mismo.

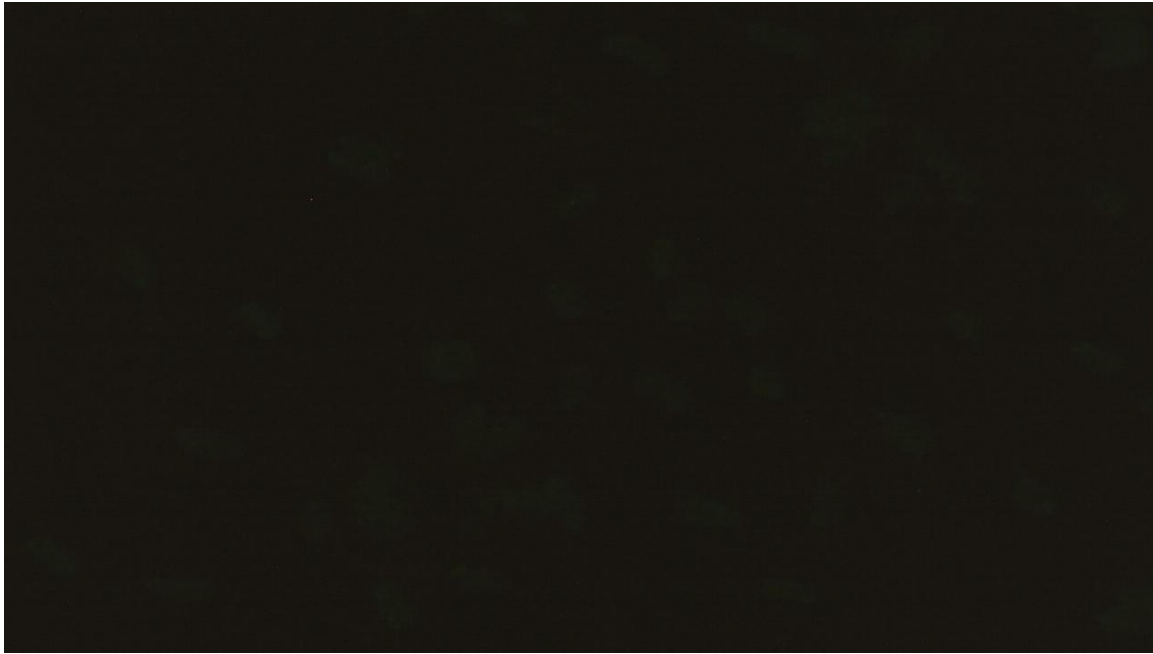


Figura 10. Resultado de un control negativo para la prueba de anticuerpos anti-ADNn por IFI. No se observa tinción fluorescente en la preparación.

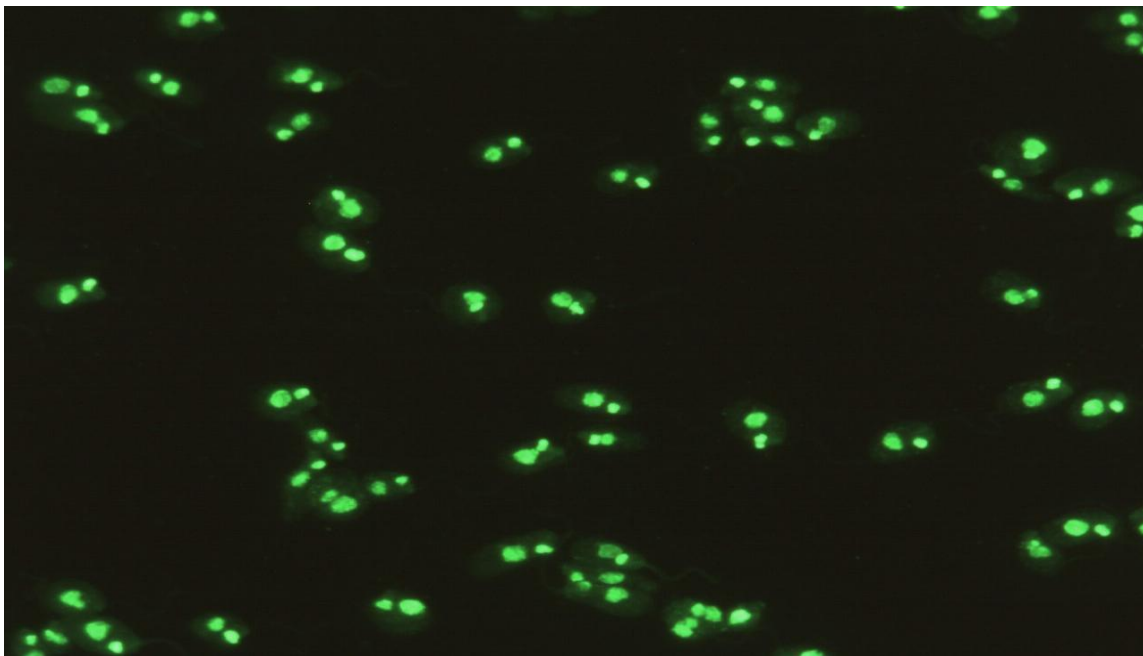


Figura 11. Tinción positiva de anticuerpos anti-ADNn por IFI con tinción conjunta del núcleo de la crithidia, la tinción del núcleo no tiene significancia analítica. El núcleo se encuentra en el centro de la crithidia y es más grande que el cinetoplasto.

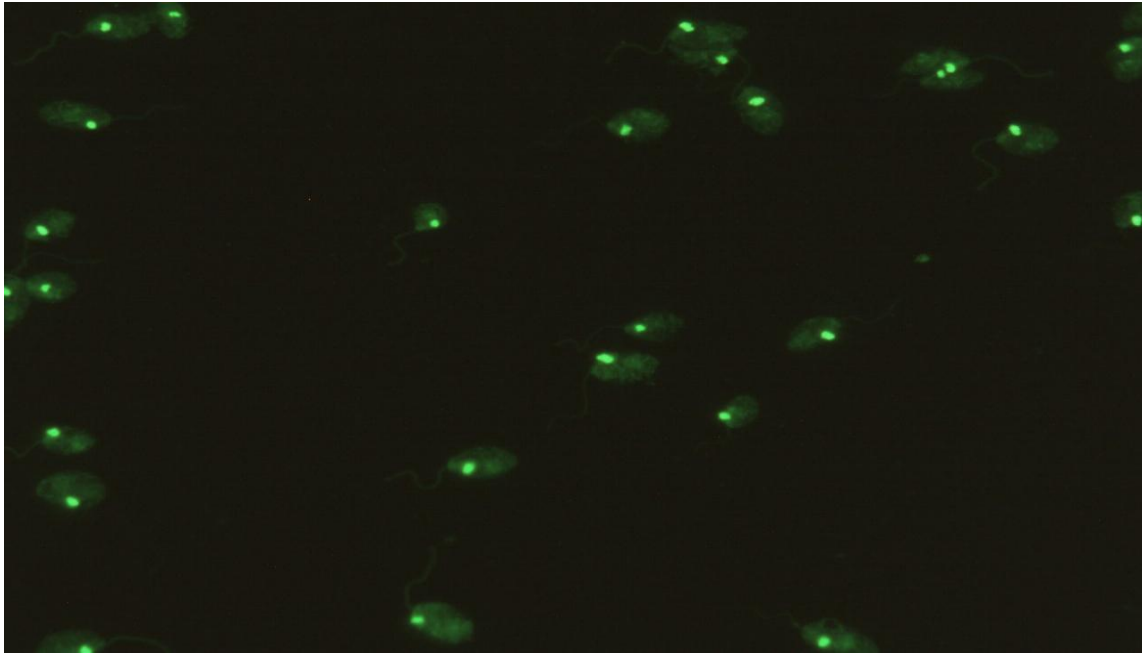


Figura 12. Tinción de una de las muestras control analizadas en este estudio, donde se observa un resultado positivo. Como en el caso del control de la casa comercial, se observa tinción específica del cinetoplasto ubicado lateralmente y en la mitad inferior del cuerpo de la crithidia.



Figura 13. Tinción de una de las muestras control analizadas en este estudio, donde se observa un resultado negativo. No hay fluorescencia específica del cinetoplasto.

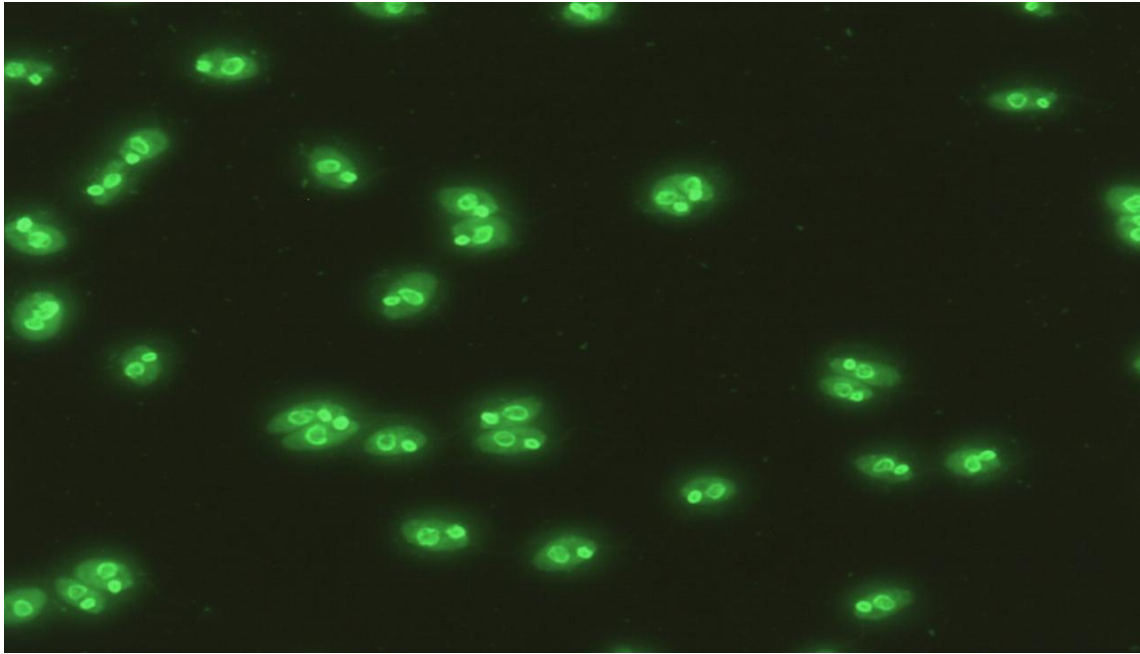


Figura 14. Tinción atípica periférica o de tipo anular. Se observa la tinción sólo alrededor del cinetoplasto con el centro negativo. Este tipo de tinción se menciona en algunos textos. El resultado obtenido por ELISA es positivo y el paciente presentó datos de actividad de la enfermedad. Se observa también tinción semejante en el núcleo de la crithidia, pero ésta carece de significancia. El núcleo se observa de mayor tamaño que el cinetoplasto y se ubica hacia el centro de la crithidia.

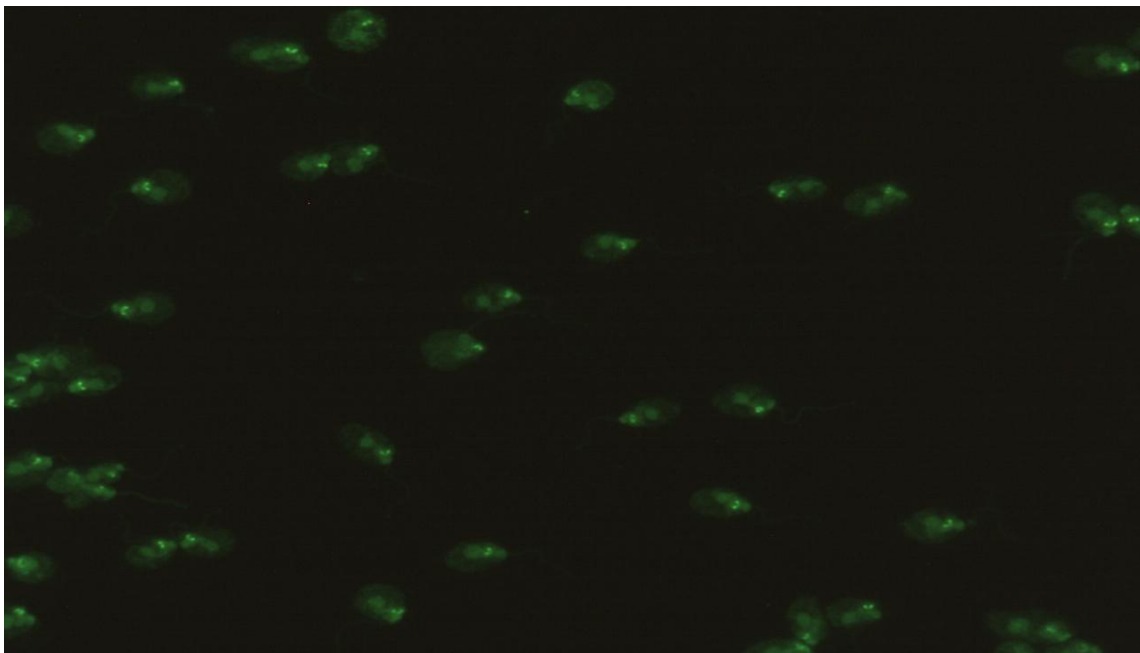


Figura 15. Tinción atípica del cinetoplasto donde se le observa como un semicírculo, casi completo, la fluorescencia verde manzana es clara y el resultado obtenido por ELISA para esta muestra es positivo así como la presencia de datos de actividad de la enfermedad.

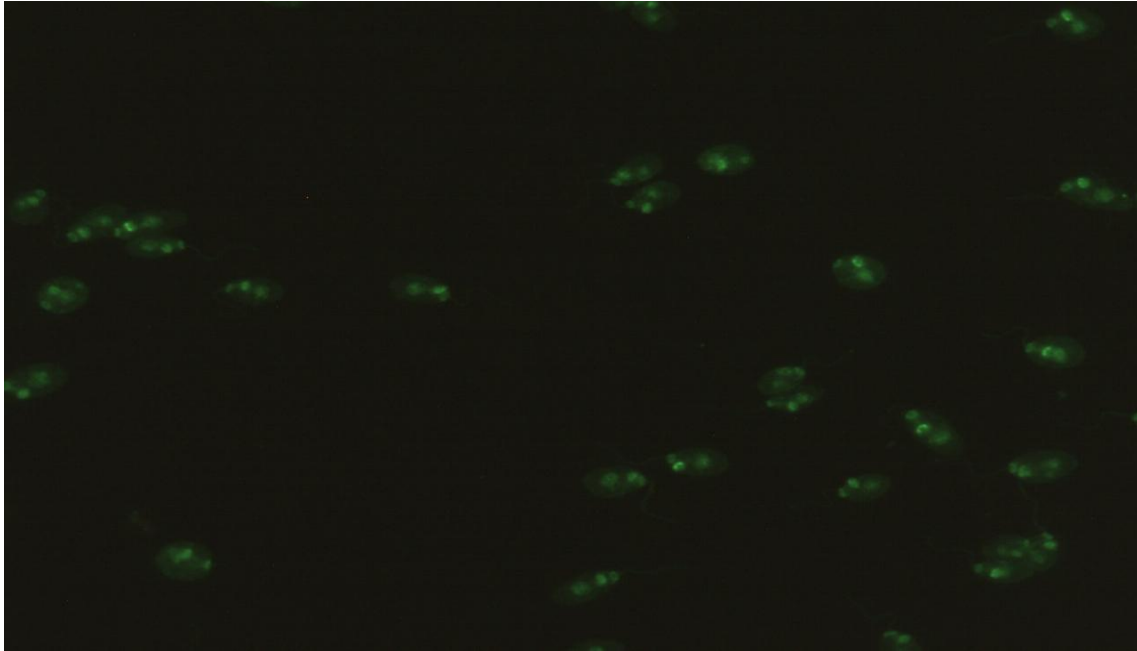


Figura 16. Al igual que en el caso anterior, se observa la tinción fluorescente en forma de semicírculo y aunque algunas células muestran tinción muy débil, el resultado obtenido por ELISA, es positivo con presencia de datos clínicos de activación de la enfermedad.

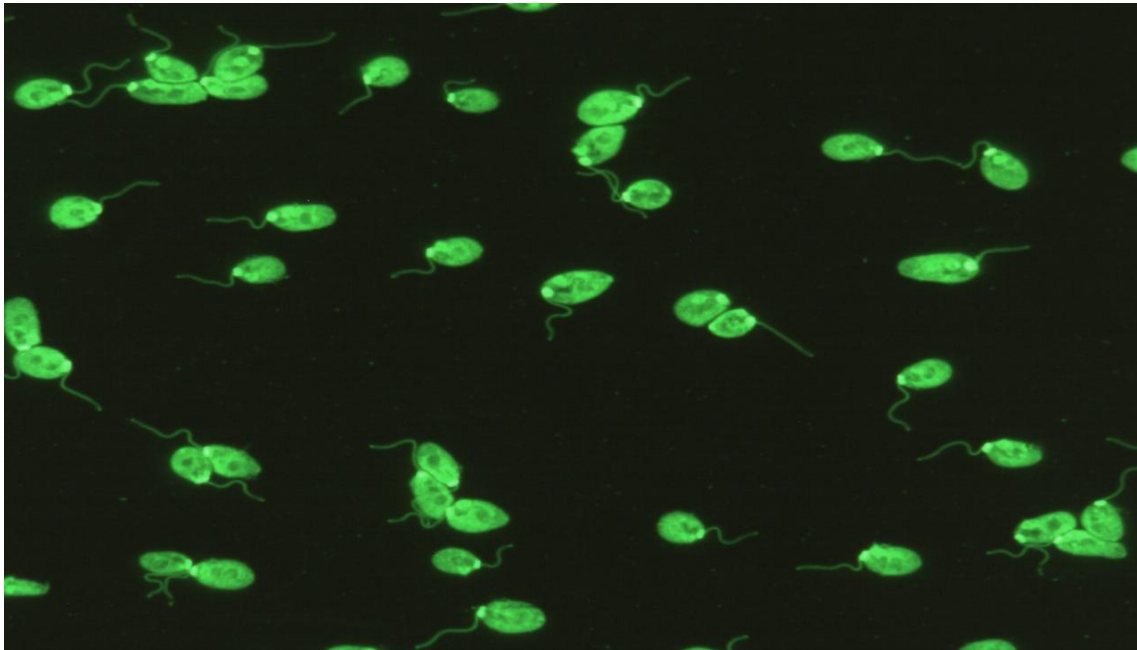


Figura 17. Tinción atípica. Se observa tinción de todo el cuerpo de la crithidia y apenas es perceptible la tinción del cinetoplasto. En algunas células, se observa tinción del cuerpo basal, la cual, puede decirse que carece de significancia. El paciente presentó datos de actividad de la enfermedad y un resultado positivo por ELISA.

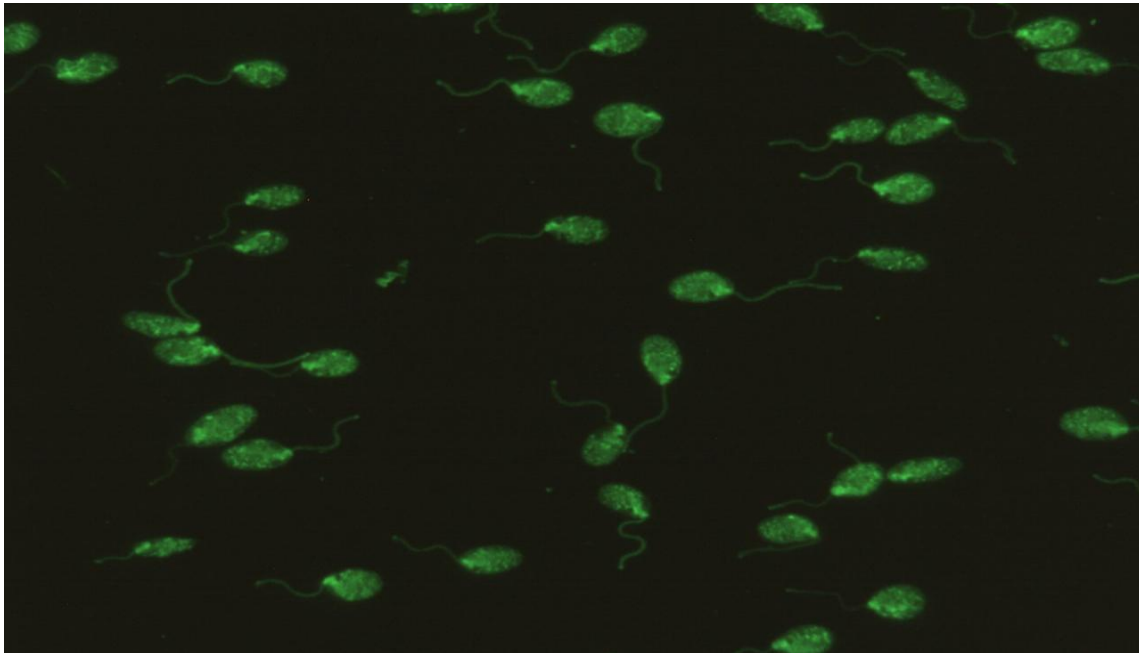


Figura 18. Tinción inespecífica de toda la crithidia; no se observa tinción distinguible del cinetoplasto, por lo que la prueba es negativa. El resultado por ELISA es negativo y los datos clínicos de enfermedad, corresponden a otro diagnóstico diferente de LES.

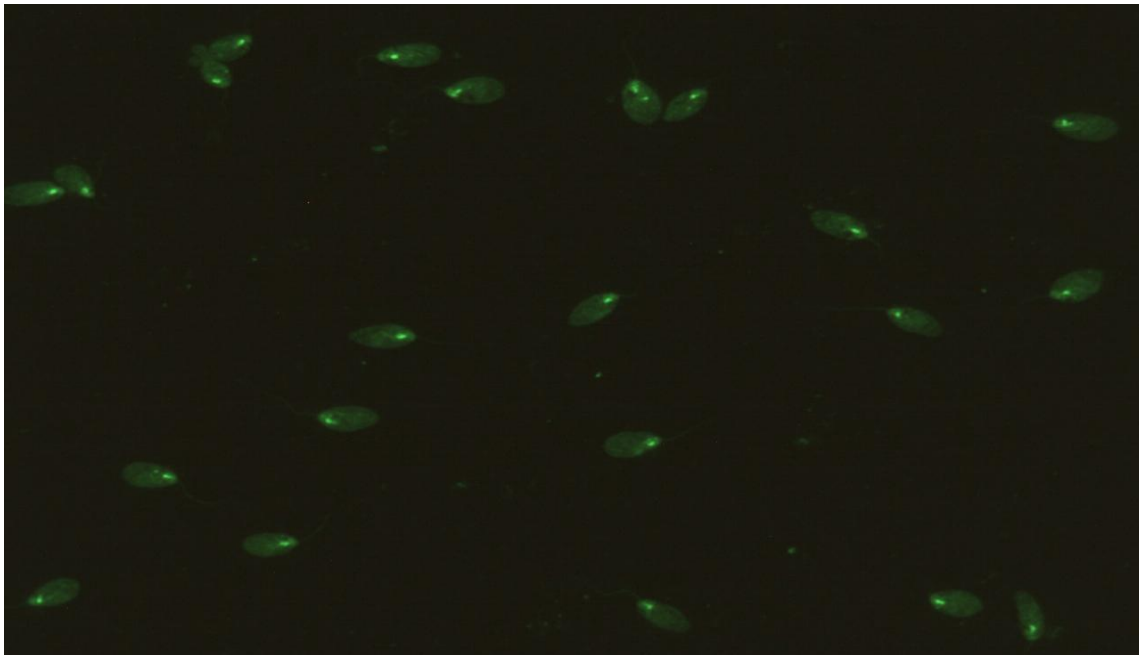


Figura 19. Tinción atípica donde se observa una especie de “punto” fluorescente. El resultado del ELISA es negativo y los datos clínicos correspondieron a un diagnóstico diferente de LES.

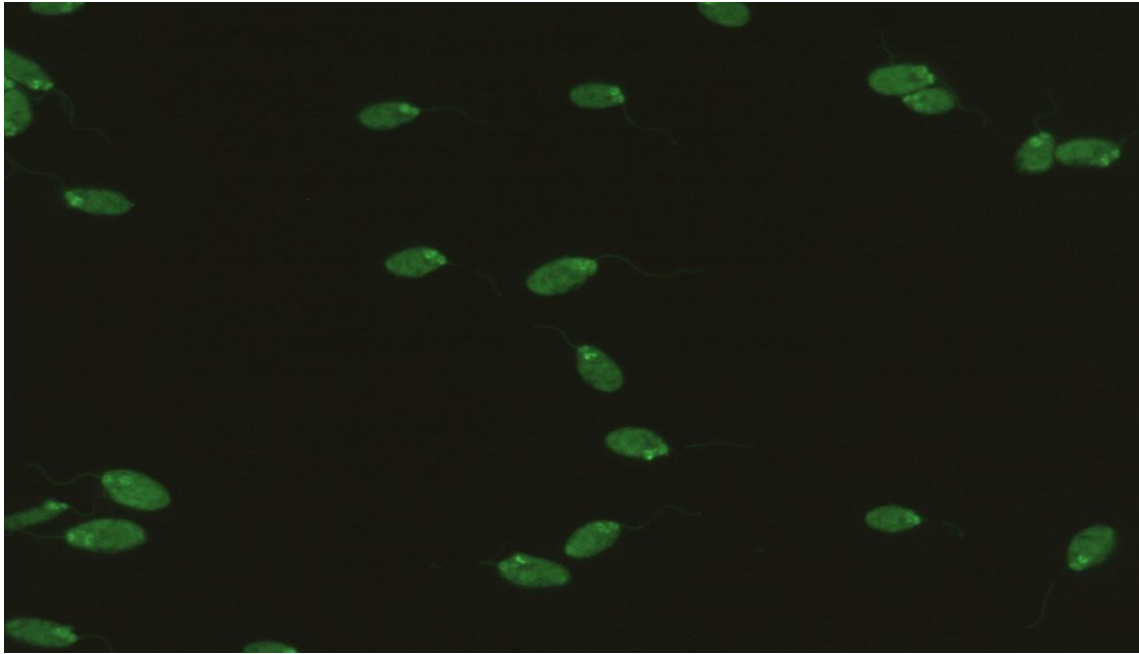


Figura 20. Tinción semejante a las figuras 15 y 16 en forma de semicírculo aunque de menor intensidad y con tinción del cuerpo de la crithidia; el resultado por ELISA es positivo y hay presencia de datos clínicos de actividad de la enfermedad.

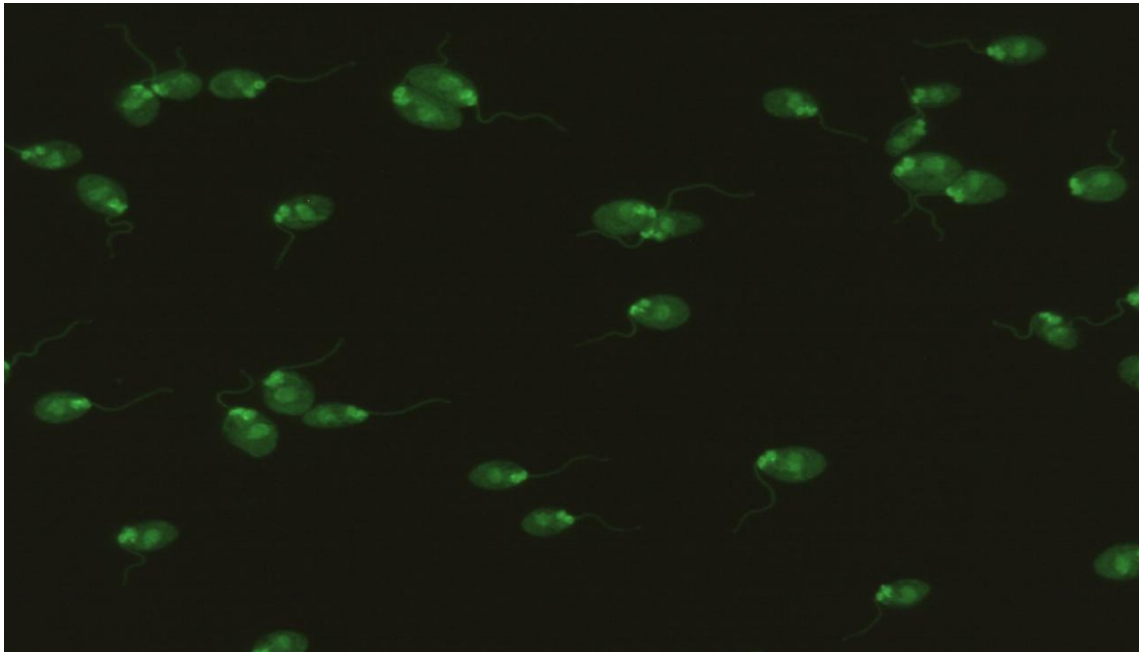


Figura 21. Tinción específica del cinetoplasto; la señal fluorescente es baja y puede confundirse con la tinción del cuerpo basal, la cual, carece de significancia. El resultado por ELISA es positivo y hay datos clínicos de activación de la enfermedad.

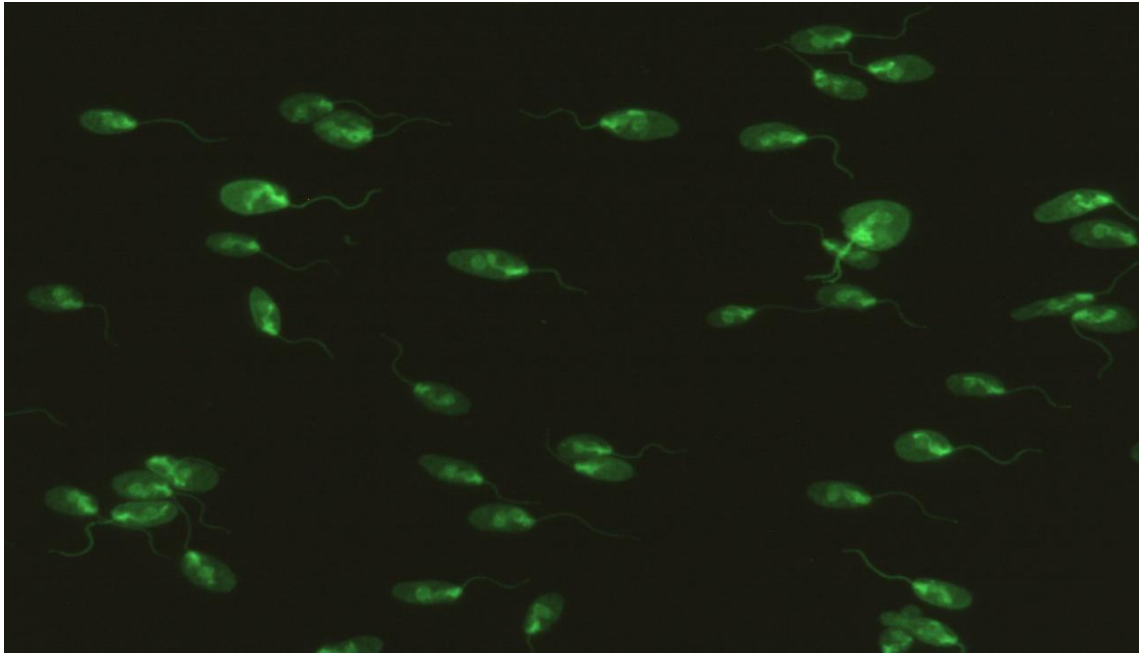
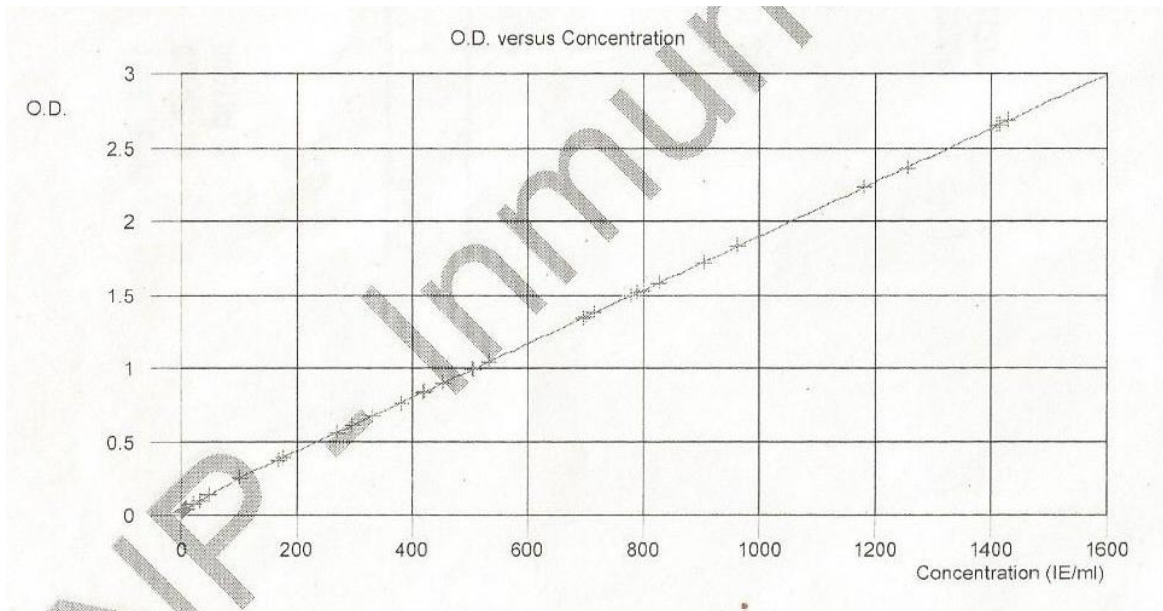


Figura 22. Tinción considerada como inespecífica ya que no es posible diferenciar tinción alguna del cinetoplasto y aunque el resultado por ELISA es positivo, el paciente no presenta datos de actividad de la enfermedad.

Resultados obtenidos por el método de ELISA (Curva de calibración).

O.D. Reader value	Quant. 1 value IE/ml
1.529	800.00
0.249	100.00
0.043	10.00



Resultados de IFI, ELISA y datos de actividad de LES.

Se presenta, a continuación, los resultados de este estudio.

Cuadro 3. Resultados obtenidos por IFI y ELISA. Cabe mencionar que las tinciones atípicas observadas, se interpretaron apegándose lo más posible a los criterios establecidos y es el resultado emitido. En el caso de los resultados obtenidos por ELISA, un valor ≥ 100 UI/mL se considera positivo.

Muestra	Resultado IFI	Resultado ELISA (UI/mL)	Datos de actividad de LES	Muestra	Resultado IFI	Resultado ELISA (UI/mL)	Datos de actividad de LES
1	++	>800	sí	26	-	210.63	no
2	+	697.19	sí	27	+	>800	sí
3	-	<10	no	28	-	>800	sí
4	++	>800	sí	29	-	5.68	no
5	-	<10	no	30	-	323.96	no
6	-	175.47	no	31	++	>800	sí
7	-	<10	*	32	-	>800	no
8	-	32.2	*	33	-	272.52	no
9	-	11.31	*	34	++	>800	sí
10	-	<10	no	35	-	<10	*
11	-	268.98	no	36	-	4.87	*
12	-	21.36	no	37	++	443.72	sí
13	-	90.7	no	38	-	224.30	no
14	-	2.46	*	39	+	596.44	sí
15	-	77.21	no	40	++	>800	sí
16	++	>800	sí	41	++	>800	sí
17	+	>800	sí	42	-	3.27	*
18	+	>800	sí	43	-	92.48	sí
19	+	445.33	sí	44	-	299.85	no
20	-	330.39	sí	45	-	3.27	*
21	-	22.56	no	46	++	400.32	sí
22	-	3.27	*	47	+	>800	sí
23	-	<10	no	48	++	>800	sí
24	+	576.34	sí	48	+	459.80	sí
25	-	<10	*	50	-	37.02	*

*En estos casos, los síntomas correspondieron a otra enfermedad diferente de LES.

Por otro lado, entre las tinciones atípicas observadas, se pudieron distinguir ciertas características de tinción que podrían considerarse patrones y que se describen a continuación:

Cuadro 4. Características de las tinciones atípicas observadas, resultado obtenido por ELISA para las mismas y su relación con datos de actividad de LES. Ejemplos de estos tipos de tinciones pueden observarse en el apartado de resultados de acuerdo a la figura señalada en el cuadro.

Patrón de tinción atípico	Descripción	No. n=50	ELISA positivo		ELISA negativo	
			Con datos de actividad de la enfermedad	Sin datos de actividad de la enfermedad	Con datos de actividad de la enfermedad	Sin datos de actividad de la enfermedad
Periférico	Tinción en la periferia del cinetoplasto(fig. 14).	8	8			
Semicírculo	Tinción parecida al patrón periférico pero que no cubre totalmente la periferia del cinetoplasto (figs. 15 y 16).	5	4	1		
Tinción total	Se tiñe totalmente el cuerpo de la crithidia (figs. 17 y 18).	11	5	2	1	3
Punto	Tinción en forma de punto fluorescente que no corresponde al tamaño del cinetoplasto (fig. 19).	15		1		14
Positivo bajo	Tinción específica pero muy débil (fig. 21).	4	4			
Tinción inespecífica	Se observa tinción que no muestra ninguna característica o patrón en particular (fig. 22)	7	1			6

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Datos estadísticos.

Si se representa la cantidad de resultados obtenidos de acuerdo a su positividad para cada método, se obtiene:

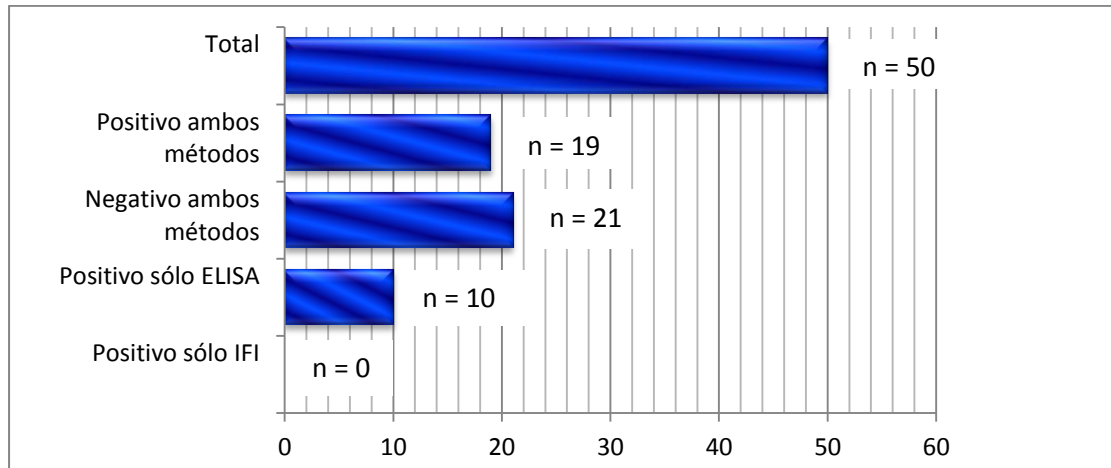


Figura 23. Frecuencia de resultados obtenidos por IFI y por ELISA (n=50).

Análisis estadístico de concordancia.

La concordancia es una medida de asociación que tiene como objetivo describir si dos variables aleatorias tienen alguna relación y que grado de intensidad tiene ésta. El estadístico más empleado como medida de concordancia es la kappa (κ) de Cohen que se define como:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Siendo P_o la proporción de concordancia observada y P_e la proporción de concordancia esperada por azar. Para hacer más comprensible estos cálculos, se utiliza una tabla de contingencia de 2X2.

Cuadro 5. Tabla de contingencia de 2X2 para el análisis estadístico de concordancia entre 2 métodos.

		Método 1		
		Positivo	Negativo	Total
Método 2	Positivo	a	b	a + b
	Negativo	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	n

Donde:

a = cantidad de resultados positivos por ambos métodos.

b = cantidad de resultados positivos por el método 2 (ELISA) pero negativos por el método 1 (IFI).

c = cantidad de resultados positivos por el método 1 (IFI) pero negativos por el método 2 (ELISA).

d = cantidad de resultados negativos por ambos métodos.

n = representa el número total de datos obtenidos.

Utilizando los datos registrados en la tabla se obtienen los valores necesarios para el cálculo del índice kappa (κ)

La proporción de concordancia observada se calcula:

$$P_o = \frac{a + d}{n}$$

La proporción de concordancia esperada por azar (P_e) se calcula:

$$P_e = \frac{(a+b) \times (a+c) + (c+d) \times (b+d)}{n^2}$$

Finalmente, para calcular el índice kappa, se sustituyen los valores obtenidos para P_o y P_e en la fórmula del inicio:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Para saber el significado del valor de kappa, se utiliza la tabla de Landis y Koch que pondera el grado de acuerdo entre las variables estudiadas desde 0 (grado de acuerdo pobre) hasta 1 (grado de acuerdo casi perfecto).

Cuadro 6. Interpretación de los valores del índice kappa según el rango de valores (Landis y Koch, 1977).

kappa	Grado de acuerdo
0.0	Pobre
0.01 – 0.2	Leve
0.21 – 0.40	Aceptable
0.41 – 0.60	Moderado
0.61 – 0.80	Considerable
0.81– 1.00	Casi perfecto

Para obtener el grado de concordancia entre IFI y ELISA, se toman los datos de la figura 8, y se colocan en la tabla de contingencia de acuerdo a lo descrito con anterioridad.

Cuadro 7. Tabla de contingencia para el análisis estadístico de concordancia entre IFI y ELISA.

		I F I		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA	Positivo	19	10	29
	Negativo	0	21	21
	Total	19	31	50

Para calcular Pe:

$$Pe = \frac{(19+10) \times (19+0) + (0+21) \times (10+21)}{50^2}$$

$$Pe = 0.48$$

Para Po:

$$Po = \frac{20 + 21}{50}$$

$$Po = 0.80$$

El cálculo de κ queda:

$$\kappa = \frac{0.80 - 0.48}{1 - 0.48}$$

$$\kappa = \mathbf{0.62}$$

Se realiza el mismo procedimiento para el análisis de concordancia entre positividad en IFI y presencia de datos de actividad de la enfermedad:

Cuadro 8. Tabla de contingencia para el análisis estadístico de concordancia entre IFI y actividad de la enfermedad.

		Datos de actividad de la enfermedad		
		Sí	No	Total
IFI	Positivo	20	0	19
	Negativo	4	26	31
	Total	24	26	50

Para calcular P_e :

$$P_e = \frac{(20+0) \times (20+4) + (4+26) \times (0+21)}{50^2}$$

$$P_e = 0.50$$

Para P_o :

$$P_o = \frac{20 + 21}{50}$$

$$P_o = 0.90$$

El cálculo de κ queda:

$$\kappa = \frac{0.82 - 0.48}{1 - 0.48}$$

$$\kappa = \mathbf{0.80}$$

Por último, para el análisis de concordancia entre positividad en ELISA y presencia de actividad de la enfermedad se colocan los datos correspondientes en la tabla de contingencia y se realiza el mismo procedimiento:

Cuadro 9. Tabla de contingencia para el análisis estadístico de concordancia entre ELISA y actividad de la enfermedad.

		Datos de actividad de la enfermedad		
		Sí	No	Total
ELISA	Positivo	23	6	29
	Negativo	1	20	21
	Total	24	26	50

Para calcular P_e :

$$P_e = \frac{(23+6) \times (23+1) + (1+20) \times (6+20)}{50^2}$$

$$P_e = 0.50$$

Para P_o :

$$P_o = \frac{23 + 20}{50}$$

$$P_o = 0.86$$

El cálculo de κ queda:

$$\kappa = \frac{0.86 - 0.50}{1 - 0.50}$$

$$\kappa = 0.72$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente estudio, fue posible observar diferentes tipos de tinción del cinetoplasto cuyas características no se encontraban descritas en ninguna referencia conocida y que ahora pueden definirse y ser tomadas en cuenta con la finalidad de que los resultados que dé el laboratorio a estas pruebas estén en el marco de un procedimiento mejor estandarizado que apoye de manera óptima el diagnóstico de los pacientes que las requieren.

Los resultados obtenidos de las 50 muestras analizadas por IFI y ELISA, así como el registro de la detección de datos de actividad de LES, se presentan en el cuadro 3, al cual, se hará referencia toda vez que se mencionen dichos resultados en el transcurso de este análisis. En cuanto a las tinciones obtenidas por IFI, éstas, pueden observarse a detalle en el apartado de resultados, y es aquí donde se dirige la atención debido a que se encontraron ciertas características específicas que se describen a continuación. Por ejemplo, en la figura 14, se muestra una tinción de tipo anular o periférica, donde la fluorescencia se encuentra alrededor del cinetoplasto con el centro oscuro; el resultado obtenido por ELISA para este tipo de muestras fue positivo y en algunos casos, con valor >800 UI/mL, cuando se sabe que el valor de corte es de 100 UI/mL. Este hecho, podría deberse a un fenómeno de prozona causado por un exceso de anticuerpos en la muestra analizada. Cabe mencionar que los pacientes con estos resultados, presentaron datos de actividad de LES. Otro caso; es el que se presenta en las figuras 15 y 16. Aquí, la tinción se observó como un semicírculo, que no cubre la totalidad de la periferia del cinetoplasto; sin embargo, la intensidad que muestra es fuerte. En estos casos, el resultado del ELISA es positivo y los pacientes presentaron datos de actividad de LES. Por otro lado, en la figura 19 se observa la tinción del cinetoplasto como una especie de punto, que de acuerdo a los criterios establecidos es negativa; lo cual, pudo confirmarse con el resultado obtenido por ELISA. Los pacientes con este tipo de tinción, no presentaron datos de actividad de la enfermedad o el diagnóstico establecido fue diferente de LES. Por último, se detectaron casos donde la tinción fluorescente cubría la totalidad de la crithidia, (figuras 17 y 18). En estos casos, es difícil realizar la interpretación de la fluorescencia; sin embargo, el criterio dice que se debe buscar la tinción específica del cinetoplasto que debe ser posible diferenciar de la tinción de fondo. Este criterio mostró ser útil, pues los resultados obtenidos por IFI concordaron en su mayoría con los obtenidos por ELISA. Sin embargo, en estos casos, puede ser preferible realizar la técnica de ELISA para evitar tener que discernir la fluorescencia inespecífica. Este tipo de tinciones pueden deberse a la presencia de ciertas proteínas presentes en el suero del paciente, aunque también se encontró que pueden ser una reacción cruzada con los parásitos que causan la enfermedad de Chagas o Leishmaniasis en zonas endémicas¹⁷. Por último, en la figura 22 se muestra una tinción totalmente atípica e

inespecífica con un ELISA positivo aunque no muy alto (268.98 UI/mL, muestra 11, cuadro 3) y donde el paciente no presenta datos de actividad de la enfermedad. Las muestras control analizadas por ambos métodos, mostraron los resultados esperados. Ejemplos de estas tinciones pueden observarse en las figuras 9 a 13 en el apartado de resultados.

Para el análisis estadístico, de las 50 muestras analizadas, se encontró que 19 fueron positivas por ambos métodos, 10 fueron positivas por ELISA y negativas por IFI, 21 fueron negativas por ambos métodos y finalmente, ninguna muestra fue positiva por IFI y negativa por ELISA. Para el análisis estadístico de concordancia, se utiliza una tabla de contingencia de 2X2 y se hace el cálculo del índice kappa, de acuerdo con el método estadístico de Cohen, el cual es utilizado porque elimina la cantidad de muestras que por simple azar, serían concordantes. El índice kappa representa la probabilidad real de concordancia entre los datos estudiados. Derivado de lo anterior, la interpretación de este índice se hace con base en la tabla de Landis y Koch que pondera el índice calculado en varias categorías de acuerdo o concordancia y que va desde 0 = acuerdo pobre, hasta 1 = acuerdo casi perfecto. De tal manera, que a medida que el índice kappa se acerca a 1 la concordancia entre los valores obtenidos se va acercando a la perfección. Es importante mencionar que el estadístico de Cohen, no determina si un método es mejor que otro, solamente nos dice el grado de acuerdo entre las mediciones realizadas.

En el presente trabajo y de acuerdo con los cálculos realizados a partir de los datos registrados en el cuadro 7, el índice kappa para los métodos de IFI y ELISA, es $\kappa = 0.62$. Interpretando este resultado con la tabla de Landis y Koch (cuadro 6), el grado de acuerdo entre los dos métodos es considerable, es decir que los resultados emitidos por IFI, son concordantes en grado considerable con los resultados obtenidos por ELISA o sea que los criterios utilizados para la interpretación visual de la fluorescencia observada, conducen a resultados muy semejantes a los obtenidos por ELISA que es un método cuantitativo que elimina la subjetividad del observador.

Por otro lado, se obtuvo el índice de concordancia entre los resultados obtenidos por IFI y la presencia o ausencia de datos clínicos de activación de la enfermedad. De igual manera, se aplicó el mismo estudio para los resultados obtenidos por ELISA. En este aspecto, hay que mencionar que evaluar la presencia o ausencia de actividad de la enfermedad fue muy variable, no se encontró una tendencia específica, debido a que, por un lado, los síntomas del LES son muy semejantes a los que se presentan en otras enfermedades, incluso enfermedades no autoinmunes, y por otro lado, entre los pacientes con diagnóstico confirmado de LES, el tratamiento inmunosupresor al que son sometidos estos pacientes, podía estar enmascarando los datos de actividad de la enfermedad, además la respuesta a la inmunoterapia, era variada entre cada paciente, incluso, había quienes no seguían el tratamiento de forma regular o que por cursar

con procesos infecciosos, tenían que suspenderlo y posteriormente reiniciarlo a veces con cargas fuertes de medicamento, de tal manera que algunas veces no fue factible observar un comportamiento regular o natural de la manifestación de los síntomas y por ende, relacionarlo a la presencia de auto anticuerpos en el suero de estos pacientes. Sin embargo, los valores obtenidos para el índice kappa fueron de 0.80 en el caso de la IFI y 0.72 para ELISA. Se observa que la mayor concordancia se encontró con la IFI; sin embargo, ambos métodos muestran un grado de concordancia considerable de acuerdo a la tabla de Landis y Koch.

A modo de terminar este análisis, se puede decir que hay tinciones en las que no es fácil realizar la interpretación adecuada; los criterios establecidos ayudan bastante cuando se habla de buscar la tinción específica del cinetoplasto, sin embargo, como pudo observarse, esta tinción puede ser diferente de lo que se conoce a cerca de que debe cubrir la totalidad del cinetoplasto, ya que una tinción de tipo anular o semicírculo se puede considerar positiva pero la tinción que es como un punto en el sitio del cinetoplasto, es negativa.

Finalmente, la detección de auto-anticuerpos es un parámetro fundamental en el diagnóstico, clasificación y tratamiento de las enfermedades autoinmunes. En este sentido, se han creado varios métodos con la finalidad de mejorar la calidad analítica, la sensibilidad y la especificidad de las pruebas, de tal manera que elegir la técnica adecuada no es fácil. Lo mejor que se puede hacer es conocer ampliamente los métodos disponibles, conocer su fundamento, ventajas, limitaciones y aplicabilidad en el laboratorio en cuestión. Es importante recordar también que el resultado obtenido por el laboratorio debe valorarse en conjunto con los signos y síntomas detectados en la revisión clínica y que contribuyen a establecer el diagnóstico adecuado. También son de utilidad las guías y algoritmos que apoyan el manejo óptimo de las pruebas de laboratorio.

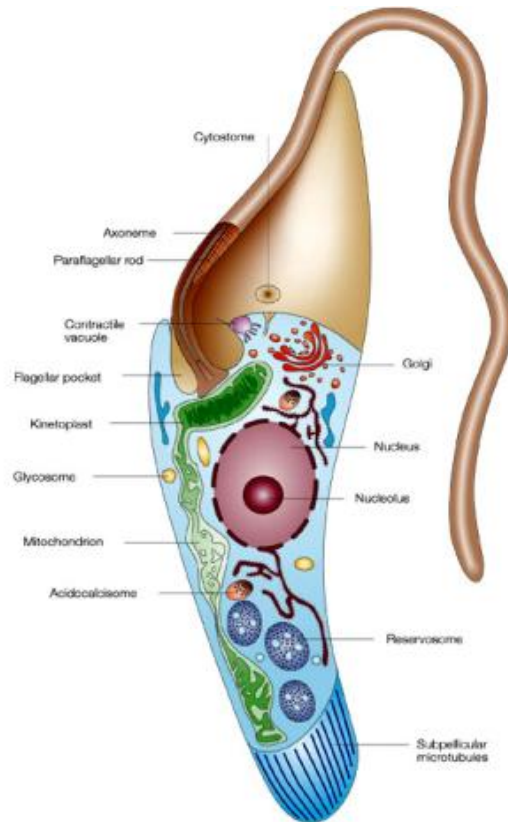
CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que los criterios utilizados actualmente para la interpretación de la IFI, han sido adecuados, sin embargo, también fue posible describir ciertas tinciones que no son las clásicas que se mencionan en los textos de Inmunología, y que sin embargo, por sus características específicas, mostraron ser de importancia para dar un resultado ya sea positivo o negativo; de tal manera, que se logró ampliar los criterios de interpretación de la IFI, para la emisión de resultados más confiables y mejor estandarizados por parte del laboratorio.

Finalmente, la concordancia entre IFI y ELISA es buena, por lo que bien podría usarse uno u otro método para el trabajo de rutina; la elección dependerá de conocer el fundamento de los métodos a utilizar, así como sus ventajas, limitaciones, etc. Sin embargo, para obtener los mejores resultados en ambos métodos, se deben seguir las buenas prácticas de laboratorio en todas las etapas del proceso analítico.

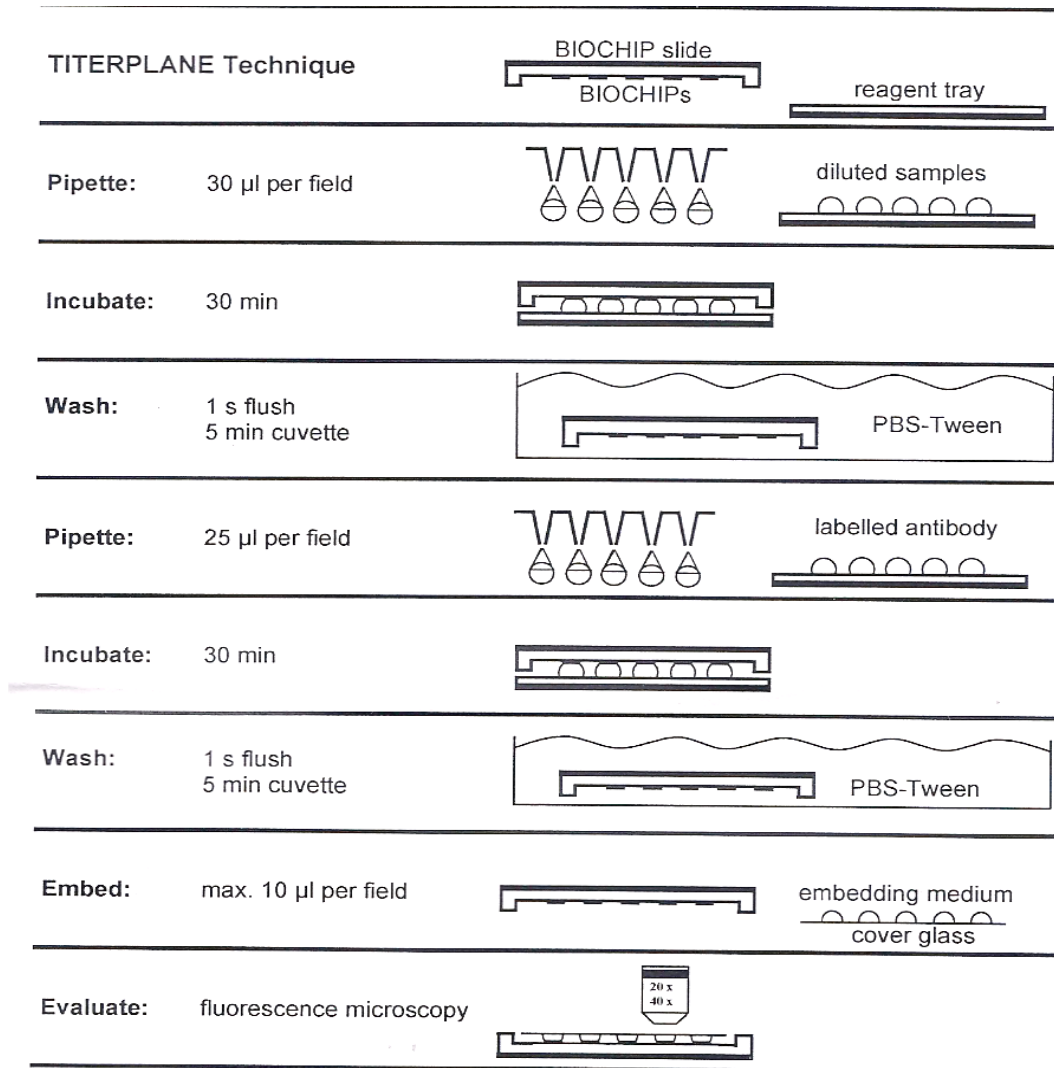
ANEXO 1

Esquema de un protozooario flagelado del Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, Género Trypanosoma; al cual pertenece *Crithidia luciliae*.



Fuente: Vargas P. L. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. Nature education [Seriada en línea] 2010; 3(9):63[4 páginas]. Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/kinetoplastids-and-their-networks-of-interlocked-dna-14368046>. Consultado Abril 2012.

Esquema de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos anti-ADNn



Fuente: Euroimmun. Crithidia luciliae (anti-dsDNA) Instructions for the indirect immunofluorescence test. Germany: Euroimmun; 2011.

REFERENCIAS

1. Regueiro GJR, López LC, González RS, Martínez NE. Inmunología. Biología y Patología del sistema inmunitario. 4ª. edición. Madrid: Médica Panamericana; 2010.
2. Gilliland B. Medicina Interna de Harrison. Distrito federal: Mc Graw-Hill; 1998.
3. Doan MDT, Melvold DR, Visselli DS, Waltenbaugh DC. Inmunología. España: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
4. Harpaz I, Monsonego A, Cohen H. El estrés lleva a un aumento en las enfermedades autoinmunes. 2013; [1 página]. Disponible en: URL: <http://www.prensajudia.com/shop/detallenot.asp?notid=33588>. Consultado Junio 5, 2013.
5. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Inmunología básica y clínica. 8ª edición. Distrito federal: El Manual Moderno; 2006.
6. Berrón PR. Enfermedades autoinmunitarias en el niño. Distrito federal: Alfil; 2007.
7. Navarrete SCL, Ibáñez GC. Rol de la Apoptosis en la Fisiopatología del Lupus Eritematoso Sistémico. Revista chilena de Reumatología. 2008;24(1):30-38.
8. Herrman M, Voll R, Kalden J. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. Immunol Today 21 (2000) 424-426.
9. Bevrá HH. Antibodies to DNA. The New Eng J of Med. 1998;338(19):1359-1368.
10. Iglesias A et al. Historia de los autoanticuerpos. Aplicación clínica de los autoanticuerpos en el Lupus Eritematoso Sistémico. Rev Mex Reumat. 2004;19(6):381-396.
11. Iglesias M. ¿Son los autoanticuerpos predictores de enfermedades autoinmunes reumatológicas? Reumatología. 2004;20(1):7-11.
12. Fischbach TF. Manual de pruebas diagnósticas. 5ª edición. Distrito federal: Mc Graw-Hill Interamericana; 1996.
13. Rouquette A M, Desgruelles C. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. Lupus 2006;15:403-407.
14. Isenberg D, Smeenk R. Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now? Lupus 2002;11:797-800.

15. Egner W. The use of laboratory test in the diagnosis of SLE. J Clin Pathol 2000;53:424-432.
16. Vargas PL. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. Nature education [Seriada en línea] 2010; 3(9):63[4 páginas]. Disponible en:
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/kinetoplastids-and-their-networks-of-interloked-dna-14368046>. Consultado Abril 2012.
17. Kokuina E, García I, Suárez J, Chico A, Casas N. Determinación de anticuerpos anti DNA de doble cadena sobre preparación nacional de *Crithidia luciliae*. Univ Diag[Seriada en línea] 2000;1(12):[4 páginas]. Disponible en:URL:http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni04200.htm. Consultado Noviembre 17, 2010.
18. Griemberg G, Ferrarotti NF, Svibel G, Ravelli MR, Taranto NJ, Malchiodi EL, et al. Inmunofluorescencia con *Crithidia luciliae* para la detección de anticuerpos anti ADN. Imágenes atípicas y su relación con enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Medicina (Buenos Aires) [Seriada en línea] 2006;66:3-8. Disponible en:
http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol_66-06/1/ Consultado Noviembre 29, 2010.
19. Hernández RD, Cabiedes J. Immunological techniques that support the diagnosis of the autoimmune diseases. Reumatol Clin[Seriada en línea] 2010;6(3):173-177. Disponible en:
[URL:http://www.boletinpanlaronline.cl/files/pdf/2010/n3/Immunological_techniques.pdf](http://www.boletinpanlaronline.cl/files/pdf/2010/n3/Immunological_techniques.pdf). Consultado Noviembre 17, 2010.
20. immco DIAGNOSTICS. Detección de anticuerpos anti-ADN nativo (nADN) Substrato *Crithidia luciliae*. USA: IMMCODiagnostics, Inc; 2009. [Seriada en línea] Disponible en:
<http://www.immco.com/img/Products/ProductLiterature/1106-2%20CE%20Product%20Insert.pdf>. Consultado Abril 10, 2012.
21. Presentación de Inmunofluorescencia. 2012; [18]. Disponible en:
<http://www.inmuoquimica.qb.fcen.uba.ar/Inmunofluorescencia2.ppt>. Consultado Abril 10, 2012.
22. Microscopía de Inmunofluorescencia.[Seriada en línea][4 páginas]. Disponible en:
http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/minmuflure_s.htm. Consultado Abril 10, 2012.
23. ImmunoConcepts. Sistema de análisis de IgG anti.ANDn por inmunofluorescencia. USA: ImmunoConcepts, N. A. Ltd; 2007.[Seriada en línea] Disponible en:
<http://www.immunoconcepts.com/inserts/DNA%20IgG%20Es.pdf>

24. Euroimmun. Crithidia luciliae (anti-dsDNA) Instructions for the indirect immunofluorescence test[folleto]. Lübeck, Germany: Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG. 2011.
25. Sontheimer RD, Gilliam JN. An immunofluorescence assay for double-stranded DNA antibodies using the Crithidia luciliae kinetoplast as a double-stranded DNA substrate. J Lab Clin Med. 1978;91(4):550-558.
26. Fernández SM. Autoanticuerpos más frecuentes en enfermedades del tejido conectivo. Revista de la Sociedad de Medicina Interna de Buenos Aires [Seriada en línea] 2010;0204:[15 páginas]. Disponible en http://www.smiba.org.ar/med_interna/vol_02/04_03.htm. Consultado Noviembre 29, 2010.
27. Nukurangi T. Cohen's Kappa. 2008;[2 páginas]. Disponible en: URL:<http://www.niwa.co.nz.our.services/online-services/statistical-calculators/cohens-kappa>. Consultado Enero 4, 2011.
28. Molinero LM. Medidas de concordancia para variables cualitativas. 2001;[3 páginas]. Disponible en: URL:http://www.seh_lelha.org/concor2.htm. Consultado Enero 4, 2011.