



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

*Prevalencia de Autoanticuerpos en Pacientes
con Diagnóstico de Esclerodermia*

TESINA

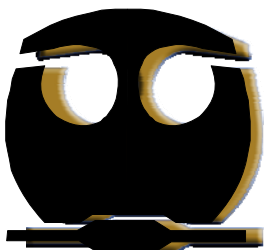
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

P R E S E N T A:

ROCIO TORRICO LAVAYEN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS



Ciudad Universitaria, mayo del 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis niñas y a mi esposo, por su paciencia y comprensión.

Agradecimientos

A Dios por la oportunidad brindada y su sostén en todo momento.

Al personal del laboratorio de inmunología de INCMNSZ, por su calidez humana y calidad profesional.

A mis compañeros de trabajo, por su apoyo y comentarios oportunos.

Contenido

Lista de acrónimos

I. Resumen

II. Introducción

III. Marco Teórico

3.1 Enfermedades autoinmunes

3.2 Esclerodermia

3.2.1. Definición

3.2.2. Clasificación

3.2.3. Epidemiología

3.2.4. Mecanismos Patogénicos

3.2.5. Manifestaciones Clínicas

3.3. Técnicas Inmunológicas Aplicadas al Diagnóstico

3.4. Principales Autoanticuerpos Relacionados

IV. Planteamiento del problema

V. Justificación

VI. Hipótesis

VII. Objetivos

VIII. Material y Métodos

8.1. Pacientes

8.2. Muestras

8.3. Detección de autoanticuerpos

8.4. Análisis estadístico

IX. Resultados

X. Discusión

XI. Conclusiones

XII. Anexos

XIII Bibliografía

Listado de Acrónimos

AAC: Anticuerpos anti-centrómero.
AAN: Anticuerpos anti-nucleares.
Ac: Anticuerpos.
ACR: Colegio Americano de Reumatología.
AECA: Anticuerpos contra células endoteliales.
AMA: Anticuerpos anti-mitocondriales.
AR: Artritis reumatoide.
CBP: Cirrosis biliar primaria.
CE: Células endoteliales.
CF: Centro Fibrilar.
CFD: Componente Fibrilar Denso.
CG: Componente Granular.
CREST: Calcinosis, Raynaud, hipomotilidad sofágica, esclerodactilia, telangiectasia.
DNAcd: Acido desoxiribonucleico de cadena doble.
DNAs: Acido desoxiribonucleico de cadena simple.
DNA-PK: DNA proteincinasa.
EIT: Electroinmuno transferencia.
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EMTC: Enfermedad mixta del tejido conjuntivo.
ES: Esclerodermia.
ESD: Esclerodermia difusa.
ESL: Esclerodermia limitada.
ET-1: Endotelina-1.
FCTC: Factor de crecimiento del tejido conectivo.
HEp-2: Células de cultivo de epiteloma humano tipo II.
HLA: Complejo mayor de histocompatibilidad (acrónimo inglés: *Human leukocyte antigen*).
hnRNA: Acido ribonucleico heterogéneo nuclear.
IFI: Inmunofluorescencia indirecta.
Ig: Inmunoglobulina.
Il: Interleucina.
kDa: kilodalton.
LEG: Lupus eritematoso generalizado.
LIA: Inmunoensayo lineal.
MCP-1: Proteína quimioattractante de monocitos tipo 1.
MF: Moteado fino.
MG: Moteado grueso.

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad.
NO: Oxido nítrico.
NOR: Organizador de la región nucleolar.
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen.
PDGF: Factor de crecimiento dependiente de plaquetas.
PH: Patrón homogéneo.
Pm/Scl: Polimiositis/Esclerodermia.
RIA: Radio inmunoanálisis.
RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.
RNApol: RNA polimerasa
RNP: Ribonucleoproteína.
SDS: Dodecil sulfato de sodio.
Sm: Smith.
snRNA: Acido ribonucleico pequeño nuclear.
snRNP: Ribonucleoproteína pequeña nuclear.
SS: Síndrome de Sjögren.
TGF- β : Factor de crecimiento transformante.

I. Resumen

La escleroderma es un conjunto de síndromes pertenecientes al grupo de trastornos del sistema inmunológico que afectan al tejido conectivo¹, caracterizado por lesión microvascular y anomalías del sistema inmune que conducen a la fibrosis de piel y órganos. No se tienen reportes conocidos acerca de la prevalencia de autoanticuerpos asociados con la enfermedad en población mexicana; por lo que no se sabe si ésta es diferente o similar a la reportada en poblaciones diferentes; pese a la relación existente con el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)².

El determinar la presencia de autoanticuerpos y analizar su especificidad, permite apoyar al clínico en la realización de un diagnóstico temprano y oportuno³.

La población en estudio, mostró mayor prevalencia de la enfermedad en el sexo femenino que en el masculino (9-10 veces mayor); presentando con mayor frecuencia la población femenina la forma limitada de la enfermedad y la forma difusa en varones.

Los principales subtipos de enfermedad, desarrollados en la población, mostraron diferentes patrones de IFI sobre células HEp-2 debido a la presencia de autoanticuerpos, confirmados por otros métodos (ELISA y EIT), los cuales permitieron la elaboración de algoritmos gracias a las correlaciones y asociaciones estadísticamente significativas.

Los algoritmos desarrollados, podrían servir de apoyo en el diagnóstico y clasificación de los pacientes con esclerodermia; al menos en la población mexicana mestiza.

Prevalencia de Autoanticuerpos en Pacientes con Diagnóstico de Esclerodermia

II INTRODUCCIÓN

La escleroderma es un conjunto de síndromes pertenecientes al grupo de trastornos del sistema inmunológico que afectan al tejido conectivo¹. Se caracteriza por lesión microvascular y anomalías del sistema inmune que conducen a la fibrosis de piel y órganos. Su pronóstico, a medida que la patología avanza muestra incrementos en la tasa de mortalidad.

La detección de los autoanticuerpos específicos para escleroderma permite establecer asociaciones con los diferentes subtipos de la enfermedad, con diversas complicaciones para los distintos órganos.

No se tienen reportes acerca de la prevalencia de los autoanticuerpos asociados a la enfermedad en población mexicana; por lo que no se sabe si ésta es diferente o similar a la reportada en poblaciones asiática, caucásica y negra; pese a la relación reportada con el complejo principal de histocompatibilidad²

Debido a los probables factores genéticos y raciales que intervienen en la esclerodermia, el realizar la determinación de autoanticuerpos presentes en pacientes del Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Subirán (INCMNSZ) con diagnóstico de esclerodermia, así como determinar su frecuencia, y establecer la relación con los patrones observados en la IFI resulta de gran utilidad para apoyar al clínico en la realización de un diagnóstico temprano y oportuno³.

El estudio consiste en la detección de anticuerpos anti-nucleares (AAN) mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI); seguida de la determinación de autoanticuerpos mediante técnicas de mayor especificidad y sensibilidad.

La identificación de asociaciones y correlaciones permitirá la elaboración de algoritmos propios de la patología que apoyen el diagnóstico, clasificación,

tratamiento y seguimiento de los pacientes, contribuyendo de ésta forma a reducir los costos de diagnóstico y tratamiento; así como a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

III MARCO TEÓRICO

3.1. Enfermedades autoinmunes

El organismo posee mecanismos activos de tolerancia, los cuales se desarrollan desde la vida embrionaria y se conservan a lo largo de la vida.

La tolerancia contra componentes propios del organismo se establece tanto en fases del desarrollo del sistema inmune (tolerancia central) como en la vida adulta (tolerancia periférica), y actúa eliminando o inactivando funcionalmente las poblaciones de linfocitos autoreactivos. De esta forma, cuando un elemento es reconocido como propio se desarrolla un mecanismo activo de no respuesta, denominado tolerancia inmunológica. En cambio, sí un elemento es reconocido como extraño, se activa la respuesta inmunológica encaminada a destruir dicho antígeno. Cuando estos mecanismos fallan aparecen en el organismo las enfermedades autoinmunes⁴.

Si bien la causa de la ruptura del equilibrio no ha sido dilucidada en su totalidad, se conocen factores que participan en el desarrollo de la autoinmunidad. Algunos de estos son⁵:

- Genéticos; la presencia de ciertos alelos del complejo principal de histocompatibilidad, principalmente del locus HLA-DR predisponen al desarrollo de enfermedades autoinmunes³.
- Hormonales; se ha descrito que enfermedades autoinmunes ocurren mayormente en mujeres teniendo inicio, principalmente, en años en que la producción de estrógenos es máxima⁴.
- 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 las células T reguladoras^{5,4}.
- Deficiencia de inmunoglobulina A; permitiendo el contacto de tejidos con ciertos antígenos que podrían inducir una respuesta contra antígenos propios.^{5,4}
- 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 la activación de la respuesta inmunológica.^{5, 4}.

- Factores ambientales y sustancias químicas que en condiciones particulares desencadenan reacciones autoinmunes^{5, 4}.
- Antigenicidad cruzada; debida a la similitud de moléculas de la membrana celular del huésped con antígenos de microorganismos^{5, 4}.
- Exposición de antígenos crípticos^{5, 4}.

Los procesos autoinmunes son generalmente patogénicos. Los autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes se asocian con la enfermedad, de donde se infiere que:

- La autoinmunidad es la responsable de la producción de las lesiones de la enfermedad.
- El proceso de la enfermedad, a través del daño tisular, conduce al desarrollo de autoanticuerpos.
- Los procesos patogénicos producen tanto la lesión como la activación de la respuesta inmunológica contra componentes propios.

La información reportada en la literatura apoya los primeros dos procesos, en la mayoría de las enfermedades autoinmunes.

La clasificación de las enfermedades autoinmunes se basa en los órganos o sistemas involucrados, con lo que se tienen que existen enfermedades autoinmunes órgano-específicas y 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 o generalizadas, 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 provocado por los

depósitos de complejos inmunes, presencia de autoanticuerpos, activación de la respuesta inflamatoria aguda y en algunos casos infiltración celular.

Un ejemplo de las enfermedades autoinmunes generalizadas es la escleroderma.⁵

3.2. Esclerodermia (ES)⁵

3.2.1. Definición

La escleroderma es una enfermedad sistémica caracterizada por depósito excesivo de colágeno a nivel cutáneo y visceral, asociado a anomalías vasculares, incluyendo vasoespasmo y oclusión microvascular³. El término escleroderma se utilizada en forma genérica para describir tanto la enfermedad limitada a la piel (escleroderma localizada) como aquella con compromiso de otros órganos (escleroderma difusa).

Su causa es aún desconocida. Se ha propuesto que la aloreactividad junto con factores genéticos y ambientales podría contribuir a la susceptibilidad individual para el desarrollo de la enfermedad^{3,7}.

3.2.2. Clasificación

La heterogeneidad de la enfermedad, ha llevado a través de los años a generar una disputa constante para su clasificación. El Colegio Americano de Reumatología (ACR)⁸ ha definido los criterios de clasificación para la ES con una sensibilidad del 97% y especificidad del 98 %. El criterio de discriminación más importante para definir la escleroderma fue la presencia de cambios de esclerosis cutánea en cualquier sitio proximal a los dedos. La suma de criterios menores que permiten alcanzar la sensibilidad referida, son la esclerodactilia, cicatrices digitales y fibrosis intersticial pulmonar bibasal, diagnosticada radiográficamente.

La escleroderma se encuentra clasificada en varios subgrupos de enfermedades que se acompañan de distintas características.

La clasificación propuesta por Carwile LeRoy⁹ en 1988 propone la subdivisión de la enfermedad en escleroderma cutánea limitada y escleroderma cutánea difusa, apoyándose en el número de características clínicas y no en criterios. Este sistema ha

sido ampliamente aceptado, no obstante que se tienen pacientes que no reúnen los criterios de clasificación pero cuadran en este sistema de clasificación, razón por la cual se ha recurrido en la actualidad a técnicas como la capilaroscopia, que ayudada al diagnóstico diferencial entre distintas etiologías como fenómeno de Raynaud y síndrome de CREST (acrónimo en inglés de calcinosis, fenómeno de Raynaud, hipomotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasias).

El diagnóstico, apoyado en la determinación de autoanticuerpos presentes en circulación, permite la aplicación de criterios para formas tempranas o limitadas de escleroderma, las cuales podrían o no evolucionar al tipo difuso. La aplicación de los criterios de ésta clasificación tiene una especificidad del 98% y una sensibilidad del 91%.

La clasificación actualizada del espectro de la esclerodermia³⁷ se muestra en la tabla a continuación (tabla 1):

Tabla 1

ESPECTRO DE TRANSTORNOS DE LA ESCLERODERMIA
<p>Fenómeno de Raynaud</p> <p>Fenómeno de Raynaud primario</p> <p>Fenómeno de Raynaud secundario</p>
<p>Esclerosis sistémica</p> <p>Esclerosis sistémica limitada</p> <p>Esclerosis sistémica cutánea limitada</p> <p>Esclerosis sistémica cutánea difusa</p> <p>Esclerosis sistémica sin esclerodermia</p>
<p>Esclerodermia localizada</p> <p>Placa morfea</p> <p>Esclerodermia lineal</p> <p>En golpe de sable (en <i>coup de sabre</i>)</p>
<p>Fuente: Zuber M., Gotzen R., Filler I. Clinical correlation of anticentromere antibodies. Clin Rheumatol. 1994;13(3):427-32.</p>

Los criterios para la clasificación de ES^{10, 11}, consideran:

1. Autoanticuerpos: anti-centrómero (AAC) detectados mediante inmunofluorescencia indirecta; anti-Scl-70 (topoisomerasa-I) detectados por inmunodifusión doble; anti-fibrilarina (U₃-RNP) mediante inmunoprecipitación.
2. Fibrosis pulmonar bibasal detectada mediante radiografía de tórax; sombras lineales o reticuladas en panel de abejas, sobre todo en la periferia y base de los pulmones.
3. Contractura en las articulaciones, definido como una limitación permanente del movimiento articular.
4. Engrosamiento dérmico, puede ser definido por la medición de piel de Rodnan modificado, el cuál utiliza la palpación clínica de la piel como está descrita.
5. Calcinosis del cutis, localizada mayormente en dedos por depósitos intracutaneos y/o subcutáneo de hidroxapatita que puede ulcerar la piel. Su detección se da por radiografía, o análisis cristalográfico o químico.
6. Fenómeno de Raynaud; palidez súbita de una estructura acral (vg. dedos, manos completas, dedos de pies, punta de la nariz, lóbulo de la oreja o lengua). El área comprometida puede subsecuentemente desarrollar cianosis y tornarse eritematoso con calentamiento. La determinación se realiza mediante seguimiento histórico del paciente u observación del médico.
7. Hipomotilidad distal esofágica detectada por esofagograma cine/video con bario, realizado en posición parada y supina. Esofagitis por reflujo que puede ser detectado por esofagogastroduodenoscopia en las formas de esofagitis erosiva o esófago de Barret.
8. Esclerodactilia, definida como engrosamiento y tironeamiento simétrico de la piel de dedos. Antes del desarrollo de la esclerodactilia puede presentarse una fase de edema digital no puntiforme de duración variable.
9. Telangiectasia, dilatación macular visibles de vasos sanguíneos cutáneos superficiales que colapsan bajo presión y se llenan lentamente cuando la presión es liberada. Comúnmente se localiza en dedos, cara, labios y lengua.

Para la clasificación de pacientes con esclerosis definitiva se requieren tres o más de los criterios expuestos.

3.2.3. Epidemiología

La ES se presenta en todo el mundo y afecta a todas las razas. En raras ocasiones comienza en la niñez y/o en varones jóvenes, aumentando su incidencia con la edad. La manifestación máxima se da entre los 30 y 50 años y su incidencia es mayor en mujeres que en hombres 3:1 incrementándose a 10-15:1, en edad reproductiva. De igual forma se ha observado una mayor afectación en la población afroamericana que en la caucásica, con observaciones similares en mestizos mexicanos³.

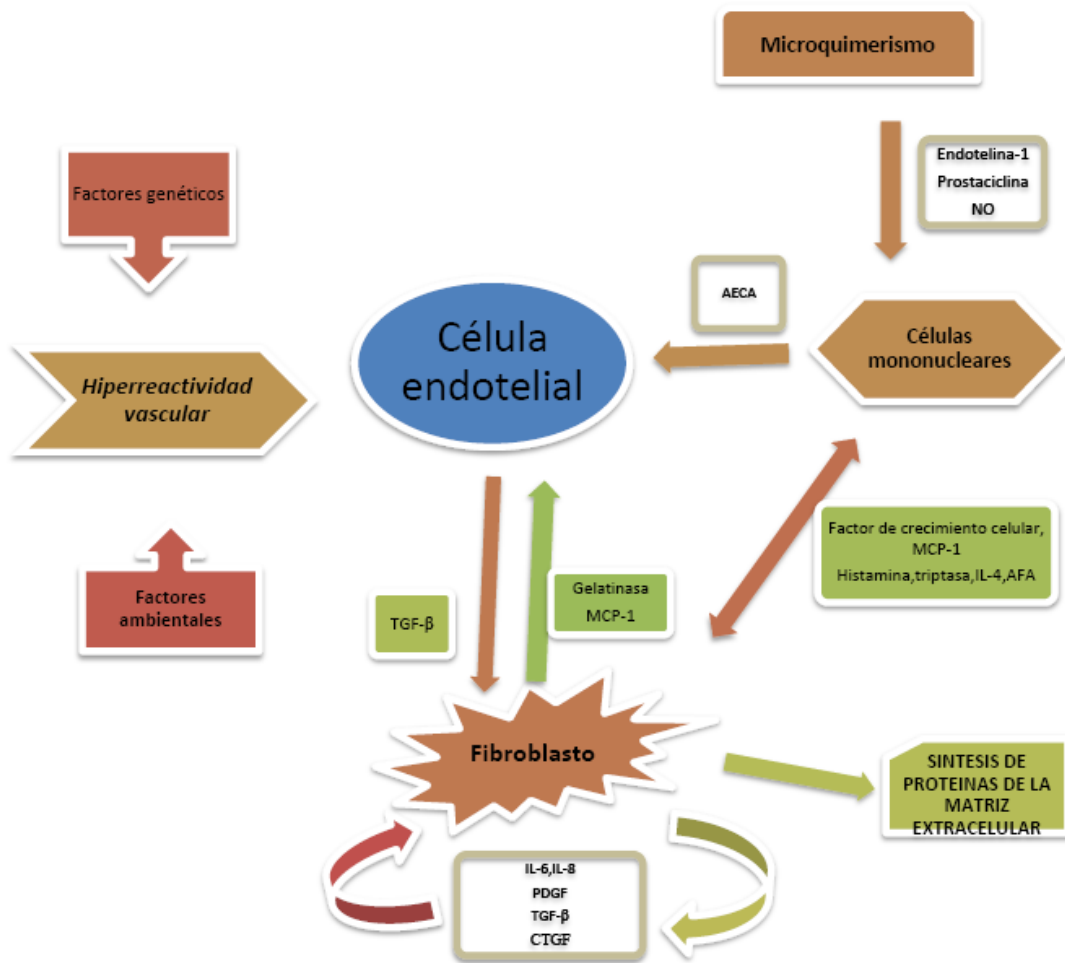
Los estudios de los marcadores genéticos³ muestran asociación con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II: HLA-DR1, DR2, DR3, DR5 y DR52, pero su correlación ha sido variada, según los distintos reportes y etnias.

Por los factores anteriormente descritos se tienen incidencias variables de la enfermedad por año, las cuales van de 14.1 casos por millón de habitantes a 19-75 casos por millón de habitantes³.

3.2.4. Mecanismos Patogénicos

La sobreproducción de matriz extracelular por los fibroblastos es el principal marcador de la escleroderma. La acumulación de colágeno es el resultado de una interacción anormal entre células endoteliales, células mononucleares y fibroblastos, lo que conduce a la producción de citocinas inductoras de fibrosis, en un contexto de sobre reactividad vascular e hipoxia tisular^{1,5}. El mecanismo propuesto se muestra en la figura 1.

Figura 1. Mecanismo fisiopatológico de la ES¹



TGF-β: Factor de crecimiento transformante
 CTGF: Factor de crecimiento del tejido conectivo
 ET-1: Endotelina-1
 IL: Interleucina

NO: Oxido nítrico
 PDGF: Factor de crecimiento dependiente de plaquetas
 AECA: Anticuerpos contra células endoteliales
 MCP-1: proteína quimioattractante de monocitos tipo 1

Tomado de Mathieu C. Tamby, Youri Chanseaud, Loïc Guillevin and Luc Mouthon. New insights into pathogenesis of systemic sclerosis. Autoimmunity Reviews 2003; 2(3):152-157.

La patogenia de la escleroderma presenta fundamentalmente tres fases:

1ª Vasculopatía: Tanto funcional como estructural misma que se expresa clínicamente como fenómeno de Raynaud y patológicamente se manifiesta como un daño y activación de las células endoteliales.

2ª Inflamación: Infiltrado perivascular, inicialmente de monocitos/macrófagos y luego de múltiples tipos celulares.

3ª Fibrosis: Aumento del depósito de componentes de la matriz extracelular, con la consiguiente destrucción de la arquitectura tisular normal, lo que constituye la base para la disfunción de órganos y tejidos comprometidos.

En estas fases intervienen componentes de la compleja cascada de mediadores primarios y secundarios como son el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), factor de crecimiento del tejido conectivo (FCTC), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), endotelina-1 (ET-1); citocinas; y quimiocinas^{1, 12}.

La interacción entre los diversos factores, junto con las diferencias individuales en las formas de la enfermedad, muestran las bases biológicas de la gran heterogeneidad de la enfermedad⁷.

Los fibroblastos activados producen cantidades excesivas de proteínas de la matriz extracelular (colágeno tipo I, III, V, VI y VII, tenascina, proteoglicanos, fibronectina y fibrilarina-1).

Los miofibroblastos, provenientes de la diferenciación de los fibroblastos, son los principales responsables del incremento en la producción de colágeno¹² el cual es dependiente de TGF- α , citosina producida por los fibroblastos y células endoteliales, además de FCTC, sintetizada por los fibroblastos estimulados por el TGF- α ². Los fibroblastos de pacientes con escleroderma también producen grandes cantidades de IL-6, IL-8 y FCDP, los cuales contribuyen a aumentar la síntesis de matriz extracelular de manera autócrina.

El endotelio es el blanco de la agresión inmune-inflamatoria que conduce a desregulación del control del tono vascular y desorganización progresiva de la arquitectura vascular, proliferación de células endoteliales (CE), engrosamiento de la túnica íntima y oclusión vascular¹⁵. Este fenómeno conduce a un aumento de la permeabilidad vascular y formación de infiltrado inflamatorio perivascular, contribuyendo al comienzo de la fibrosis. La disfunción vascular endotelial en los pacientes se caracteriza por incremento de los mediadores vasoconstrictores.

Diferentes factores citotóxicos solubles, como: granzima-A, citocinas pro-inflamatorias, anticuerpos contra células endoteliales (AcCE) y quimiocinas podrían contribuir a la activación de las CE².

Los mastocitos frecuentemente degranulados se localizan junto a los miofibroblastos y activan la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos a través de la secreción de histamina y triptasa, estimulando aún más la síntesis de colágeno¹².

En una fase temprana, los fibroblastos expresan incremento del factor estimulante de células madre, con lo que promueven el desarrollo de mastocitos¹². Además se detectan principalmente linfocitos T, evidenciándose que estos son oligoclonales, lo que sugiere una proliferación *in situ* y probablemente patogénica^{12, 14}. La activación de las células T podría darse por antígenos específicos, relacionados con microquimerismo, autoantígenos y/o infecciones virales.

Se han identificado numerosos autoanticuerpos en los sueros de los pacientes con escleroderma, sin embargo su papel patogénico permanece incierto.

3.2.5. Manifestaciones Clínicas

a) Manifestaciones vasculares.

La afectación de las arterias digitales origina el denominado fenómeno de Raynaud, que consiste en ataques periódicos vasoespásticos con palidez y/o cianosis de dedos, seguidos de hiperemia por reperusión. Los ataques suelen desencadenarse tras la exposición al frío o a tensión emocional. Aparece en el 100% de las formas de escleroderma limitada y hasta en el 75% de las formas difusas. Llegándose a originar infartos en pulpejos de dedos con ulceraciones o

gangrena evidente con riesgo de complicaciones de tipo infeccioso, que pueden incluso afectar al hueso subyacente.

Su ausencia se ha descrito asociada a un mayor riesgo de afectación renal, la cual no sólo se atribuye a fenómenos vasoespásticos, sino también a la lesión estructural de los vasos sanguíneos.

Las alteraciones en la microcirculación son también responsables de una manifestación cutánea típica de la ES, como es la telangectasia que suele presentarse en dedos, palmas de manos, cara, típicamente en pacientes con la forma limitada. Además de la piel, pueden localizarse en mucosa oral y en el tracto gastrointestinal.

Las alteraciones vasculares pueden afectar de forma inusual los vasos de gran calibre con lo que quedan implicadas en la etiopatogenia de la hipertensión pulmonar no asociada a afectación del parénquima pulmonar, la crisis renal esclerodérmica y el denominado Raynaud coronario⁸.

b) **Manifestaciones cutáneas**

Se presentan prácticamente en el 100% de los pacientes con escleroderma, aunque se ha descrito una forma, la escleroderma sin escleroderma, que no presenta las manifestaciones cutáneas.

El endurecimiento de la piel en las zonas proximales a las articulaciones metacarpofalángicas o *acroesclerosis* proporciona el diagnóstico definitivo en el 90% de los casos, sin embargo, la esclerodactilia por sí sola no permite el diagnóstico, ya que puede estar relacionada con otros procesos como la enfermedad de Raynaud u otras alteraciones de la circulación periférica. En los pacientes con formas limitadas, la afectación cutánea comienza por los dedos de las manos y pies, evolucionando lentamente durante años a antebrazos, cara y cuello. En los pacientes con formas difusas, progresa rápidamente durante meses, desde manos y pies a antebrazos, piernas, muslos y tronco⁵.

La calcinosis es otra manifestación cutánea que consiste en el depósito de calcio a nivel subcutáneo, asentando sobre prominencias óseas de dedos, antebrazos,

codos, rodillas, cresta ilíaca y zonas paravertebrales. La piel donde se asientan se torna eritematosa y acaba ulcerándose, dando salida a un material blanco y espeso constituido por cristales de hidroxapatita. La causa de la calcinosis es desconocida y no se han registrado alteraciones en el metabolismo fósforo-calcio⁵.

c) **Manifestaciones gastrointestinales**

Se presentan en la mayoría de los pacientes y difiere poco en los dos subgrupos de ES. La manifestación más frecuente es la afectación esofágica (50 % de los casos) y consiste en plenitud epigástrica, dolor en el epigastrio y regurgitación del contenido gastrointestinal. En pacientes inmunocomprometidos se presentan infecciones por el virus herpes simple, citomegalovirus y candidas⁵.

El tránsito gastrointestinal se ve reducido, lo cual produce manifestaciones como distensión y dolor abdominal; así como síndrome de mala absorción con pérdida de peso, diarrea y anemia. El duodeno se ve afectado con mayor frecuencia que el estómago dando lugar a sensación de plenitud postprandial, náuseas, vómitos y anorexia. La hipomotilidad del yeyuno e íleon, que afecta a 20% de pacientes, se debe a la pérdida de músculo liso lo cual provoca sobrecrecimiento bacteriano que da lugar a malabsorción y posterior malnutrición. Las alteraciones en colon pueden observarse en 10-50% de los casos de esclerodermia causando estreñimiento secundario e impactación fecal⁵.

d) **Manifestaciones músculo esqueléticas**

La contractura articular secundaria al engrosamiento y retracción dérmicos es la forma de afectación articular más frecuente en la ES.

Pueden aparecer poliartralgias de grandes y pequeñas articulaciones, frecuentes al inicio de la enfermedad. Sin embargo, la artritis es poco frecuente; aunque ocasionalmente puede ser muy intensa y erosiva.

La afectación tendó-sinovial sobre muñecas, dedos, rodillas o tobillos aparece en el 60 % de los pacientes con ESD y en menos del 10% de los pacientes con ESL, lo que constituye un signo de gran valor diagnóstico.

Radiológicamente se observa reabsorción de falanges distales, porción distal del radio, cúbito, mandíbula y porción superior de las costillas posteriores. Pueden observarse también osteoporosis yuxtarticular y osteoporosis.

Las dos formas de miopatía que se presentan, la primera consistente en afectación muscular proximal no progresiva sin signos de inflamación. Y una segunda miopatía inflamatoria clásica más frecuente en la forma difusa de la enfermedad⁸.

e) **Manifestaciones pulmonares**

La afectación intersticial se presenta en más del 70% de los casos. Aparece con más frecuencia en pacientes con ESD, asociada a síndrome de Raynaud grave, úlceras digitales y roces de fricción tendinosos que con el tiempo pueden desarrollar hipertensión pulmonar secundaria.

La hipertensión pulmonar, no asociada a afectación parenquimatosa, aparece en el 10 % de los pacientes con la forma limitada y tras varios años de evolución. Se caracteriza por disnea intensa y es rápidamente progresiva en ausencia de afectación parenquimatosa⁸.

f) **Manifestaciones cardíacas**

Las manifestaciones cardíacas primarias consisten en un cuadro de pericarditis acompañada o no de derrames, insuficiencia cardíaca y bloqueo cardíaco de distintos grados, o bien arritmias detectables hasta en un 50% de los pacientes con ESD.

La mayoría de los pacientes con ESD, tienen alteraciones cardíacas que pueden manifestarse a nivel de miocardio, pericardio, sistema de conducción o en forma de arritmias.

La aparición de manifestaciones clínicas, ocurre en el 10% de los pacientes y constituye un factor de mal pronóstico. Las alteraciones cardíacas asintomáticas son muy frecuentes. La afectación vascular no es clara, a diferencia de lo que ocurre en otros órganos. Aparte de la clínica, la evaluación de la afectación cardíaca en los pacientes incluye la práctica de un electrocardiograma, radiografía de tórax, Holter-Electrocardiograma y ecografía-doppler. El tratamiento, es fundamentalmente sintomático⁵.

g) **Manifestaciones renales**

Inicialmente catalogada como la primera causa de muerte en casos de esclerosis. La crisis renal aguda y grave se presenta en 10% de los pacientes y hasta 50% presentan algún tipo de disfunción renal como proteinuria, alteraciones en el sedimento urinario, hipertensión arterial o disminución del filtrado glomerular. Estudios realizados en cadáveres, hasta 80% de los pacientes presentan lesiones histológicas vasculares a nivel renal. En pacientes con ESD, se presenta generalmente al inicio (menos de 4 años desde la aparición de los síntomas) y suele hacerlo en fases de afectación dérmica rápidamente progresiva. Es poco frecuente en pacientes con forma limitada. Sin una fase previa, el paciente desarrolla una hipertensión arterial maligna y fallo renal oligúrico agudo⁵.

Habitualmente las crisis renales, en escleroderma, se presentan en épocas frías, por lo que se ha sugerido la existencia de un fenómeno de Raynaud renal.

h) **Otras manifestaciones clínicas**

El síndrome de Sjögren se presenta en el 20% de los pacientes y puede deberse a infiltración linfocitaria o sustitución fibrótica. Hipotiroidismo asociado a inflamación linfocitaria o sustitución fibrosa de la tiroides. Neuropatía sensitiva del trigémino y de otros pares craneales, normalmente asociadas a ESL. Cirrosis biliar, principalmente asociada a ESL⁵.

3.3 Técnicas inmunológicas aplicadas al diagnóstico

Las principales técnicas de detección de autoanticuerpos que se emplearan en el presente trabajo son:

a) Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Técnica de primera elección para detectar anticuerpos antinucleares (AAN). Ésta técnica se realiza sobre células tumorales mantenidas en cultivo (HEp-2), esto por la cantidad de antígenos nucleares que contienen y la consiguiente posibilidad de detectar o no anticuerpos en los sueros del paciente con enfermedades autoinmunes⁸.

El sustrato antigénico, fijado en portaobjetos, se incuba con el suero del paciente (anticuerpo). Un anticuerpo dirigido contra la región Fc (Fracción cristalizable) de las inmunoglobulinas unido a isotiocianato de fluoresceína permite visualizar la reacción cuando se observa en microscopio de epifluorescencia. Los autoanticuerpos clínicamente significativos son de isotipo IgG; aunque también se puede detectar la presencia de IgM e IgA.

En algunos casos no se pueden detectar autoanticuerpos en los sueros de los pacientes, mediante IFI, por lo que se deben usar otras técnicas, descritas más adelante, que pueden incrementar la sensibilidad hasta un 100%.

Al utilizar células HEp-2, como sustrato, se debe tener en cuenta los diferentes patrones de tinción, ya que pueden indicar la presencia de diferentes anticuerpos. Los principales patrones de tinción observados son: ^{10, 3, 8, 15}.

-Homogéneo: presente principalmente en lupus eritematoso generalizado (LEG) y lupus inducido por medicamentos.

-Periférico: presente principalmente en LEG y hepatitis crónica activa.

-Moteado grueso: presente principalmente en enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC).

-Moteado fino: presente principalmente en síndrome de Sjögren (SS) y escleroderma.

- Nucleolar: presente principalmente en escleroderma y artritis reumatoide (AR).
- Centromérico: presente principalmente en síndrome de CREST.
- Citoplásmico: presente principalmente en LEG, AR, SS, polimiositis y EMTC.
- Mitocondrial: presente principalmente en LEG, cirrosis biliar primaria (CBP) y otras enfermedades del tejido conjuntivo.

Diversos estudios muestran que los patrones de IFI correlacionan con la especificidad de autoanticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunes. Los principales se resumen en la tabla 2¹⁶.

Tabla 2
Relación de Autoanticuerpos, Antígenos y Enfermedades Asociadas

Anticuerpo	Localización	Antígeno reconocido	Enfermedad asociada
Anti-DNAcs Anti-DNAcd Anti-poli-ADP-ribose Anti-Scl-70 Anti-centrómero Anti-histona	Cromatina	DNAcs DNAcd Poli-ADP-ribose DNA topoisomerasa Centrómero Histona	LEG LEG LEG EG CREST Lupus inducido por medicamentos
Anti-U1RNP Anti-Sm Anti-U2RNP Anti-SSA/Ro Anti-SSB/La Anti-PCNA Anti-Ku	Núcleoplasma	U1RNP U1,U2,U4/U6,U5 RNP U2RNP hY1 hY5 RNP RNA polimerasa III DNA polimerasa δ DNA-dependiente de proteincinasa	EMTC LEG Síndromes de sobreposición Síndrome de Sjögren Síndrome de Sjogren LEG Síndromes de sobreposición
Anti-U3RNP Anti-7-2(Th) RNP Anti-RNA polimerasa I Anti-PM-Scl	Nucleolo	U3RNP (fibrilarina) RNAsaP, RNAsaMRP RNA polimerasa I Complejo de 11 proteínas (20-110 kD)	ES ES ES Síndromes de sobreposición

Anti-NOR-90		hUBF (human Upstream Binding Factor)	ES
Anti-Jo-1 Anti-P ribosomal Anti-mitocondrial Anti-SSA/Ro Otros (anti-actina, citoqueratina, etc.)	Citoplasma	Sintetaza Histidina-RNA Proteínas ribosomales 60S subunidad P0-P2 Mitocondria hY1-hY5 RNP	Polimiositis/Dermatomiositis LEG CBP Síndrome de Sjögren
Fuente: Fernández M.S. Autoanticuerpos más frecuentes en enfermedades del tejido conectivo. Revista de la Sociedad de Medicina Interna de B. Aires; 02 del 2004.			

Los AAN además de ayudar al diagnóstico de la enfermedad autoinmunes, son útiles para establecer asociaciones con diferentes manifestaciones clínicas.

En cuanto a la interpretación de resultados se considera reacción negativa cuando la imagen nuclear específica es menor o igual a la del control negativo o menor o igual al valor de referencia para cada patrón en comparación con el estudio de grupos de sujetos sanos estudiados, en el que se debe de tomar en cuenta la etnicidad³².

Las muestras pueden presentar distintos grados de fluorescencia inespecífica debida a los anticuerpos heterófilos o a niveles bajos de autoanticuerpos contra componentes del citoplasma, tales como proteínas contráctiles¹⁶.

La reacción positiva se define como la imagen nuclear específica y presenta un patrón definido con intensidad mayor a la del control negativo y la del valor de referencia para el grupo de sujetos sanos, en el que se toma en cuenta la etnicidad. En cuanto a los patrones, como se mencionó anteriormente, éstos pueden ayudar a inferir el o los antígenos reconocidos por los autoanticuerpos presentes en los pacientes con enfermedades autoinmunes y algunos de ellos se asocian con manifestaciones clínicas específicas¹⁶.

La descripción de los principales patrones observados en pacientes con escleroderma estudiados se detalla en los anexos del presente trabajo.

b) Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Técnica inmunoenzimática más empleada para la detección de autoanticuerpos debido a su sensibilidad; ya que permite detectar concentraciones bajas de anticuerpos. El principio consiste en fijar el antígeno en placas de poliestireno e incubarlo primero con el suero del paciente y después con un anticuerpo específico contra la región Fc humana, el cual está conjugado con una enzima. Posteriormente se añade el cromógeno sustrato de la enzima y el sustrato enzimático específico. La presencia de autoanticuerpos específicos se cuantifica mediante espectrofotómetro. Este procedimiento, presenta como su mayor dificultad la purificación del antígeno, pero en la actualidad se cuentan con equipos comerciales para la detección de los principales autoanticuerpos y con antígenos recombinantes en muchos de los casos¹⁶.

c) Electroinmunotransferencia (EIT)

De las técnicas inmunoenzimáticas la EIT es la más sensible. Consiste en enfrentar el suero del paciente con los antígenos separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y electro transferidos a papel de nitrocelulosa o nylon. Los antígenos se solubilizan con dodecilsulfato de sodio (SDS) y 2-mercaptoetanol. Una vez que se unen a la nitrocelulosa se incuban primero con el suero del paciente y luego con un anticuerpo específico de la región Fc humana, el cual está conjugado con una enzima. Al agregar el cromógeno y el sustrato enzimático, se colorea la reacción indicando la presencia del autoanticuerpo. La principal desventaja de ésta técnica, en la mayor parte de los casos, es no ser cuantitativa¹⁷.

3.4 Principales Autoanticuerpos Relacionados

Algunos anticuerpos presentes en escleroderma forman parte de los criterios para su diagnóstico y clasificación, por lo que la prevalencia varía de acuerdo al tipo de escleroderma. Estudios recientes muestran que existen anticuerpos que tienen correlación entre el grado de afectación y el pronóstico del paciente^{3, 6} por lo que podrían tener valor predictivo^{3, 6}. En pacientes mexicanos con ES se desconoce la

especificidad y prevalencia de los autoanticuerpos antinucleares y el o los antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos presentes en estos pacientes.

Los pacientes con ES tienen en circulación múltiples autoanticuerpos que reconocen componentes nucleares y citoplásmicos. En el apartado siguiente se describen los de mayor frecuencia reportada en la literatura.

3.4.1. Autoanticuerpos Antinucleares (AAN)

Son aquellos anticuerpos que reconocen componentes del núcleo y se pueden clasificar en cuatro grupos principales.

A. Autoanticuerpos contra antígenos de la cromatina ^{17, 18}

A.1. Anticuerpos anti-nucleosomas.- Los nucleosomas son la estructura básica de la cromatina, la cual es la unidad compacta fundamental del DNA. Los autoanticuerpos anti-nucleosomas están dirigidos contra epítomos localizados en las histonas, en la interacción histona-DNA, en el DNA de cadena doble (DNAcd), DNA de cadena sencilla (DNAcs) y contra epítomos conformacionales entre los componentes¹³.

Los anticuerpos anti-nucleosomas están presentes en 31 a 100 % de los pacientes con LEG y con menor frecuencia en enfermedades como ES y EMTC.

Debido a su alta especificidad son importantes en el diagnóstico de LEG, sobre todo en pacientes cuyos títulos de anticuerpos anti-DNAcd son negativos. Como marcador serológico con significancia clínica, la detección de anticuerpos anti-nucleosomas durante el curso de la enfermedad, resulta importante por su correlación con daño renal¹⁵.

A.2. Anticuerpos anti-topoisomerasa.- Son anticuerpos dirigidos contra las enzimas topoisomerasas, las cuales participan en el reconocimiento y superenrollamiento de DNA en su proceso de replicación y transcripción.

Los anticuerpos anti-topoisomerasas, también conocidos como anti-Scl-70 son marcadores serológicos ampliamente usados en el diagnóstico de ES. Los estudios

muestran que su sensibilidad varía entre el 34% y 40%, con prevalencias que van del 20 al 60% en pacientes con el tipo cutáneo difuso y del 46 al 56% en aquellos con problemas pulmonares. En relación a los grupos étnicos se ha reportado una mayor frecuencia en afroamericanos que en caucásicos¹⁹.

En IFI el patrón que se observa es moteado fino, con predominio de anticuerpos de isotipo IgG, sin embargo, entre el 77 y el 94 % de los pacientes con diagnóstico de ES tienen títulos altos de anti-topoisomerasa-I de isotipo IgA. Evidencias indirectas sugieren que la producción de anticuerpos anti-Topoisomerasa-I es dependiente de la participación de células T³.

A.3. Anticuerpos anti-centrómeros (AAC).- Los anticuerpos anti-centrómeros reconocen una familia de proteínas que componen los centrómeros, específicamente en células eucariotas. Son tres las principales proteínas reconocidas asociadas al centrómero: CENP-A, CENP-B y CENP-C¹³.

El uso de sueros de pacientes con anticuerpos anti-CENP, permitió entender los mecanismos de orden de las estructuras cromosómicas y la división celular. No se tiene una evidencia directa del papel patogénico que tienen los AAC, sin embargo se ha visto que pueden interrumpir la mitosis, o las fases previas de ésta¹⁷.

La presencia de los AAC tiene una alta prevalencia en ESL (20-35%) y se presentan con baja frecuencia en ESD. Los individuos con títulos altos presentan diversas manifestaciones clínicas que se asocian con la presencia de los anticuerpos. Los AAC tienen muy baja frecuencia en pacientes sin manifestaciones clínicas de ES y en otras enfermedades autoinmunes como AR o LEG (5%), y SS primario es de 10%. La presencia de AAC es menor en grupos afroamericanos y negros sudafricanos²⁰.

La detección de los AAC mediante IFI se facilita con el empleo de la línea celular HEp-2 usada como sustrato¹⁷. Los ELISAs para las diferentes proteínas (CENP-A, B y C) se usan como pruebas confirmatorias y de especificidad.

La especificidad de los AAC en ES en relación a controles sanos y otras enfermedades de tejido conjuntivo y fenómeno de Raynaud primario, es de 99.9%, 97.4% y 90.0% respectivamente y su sensibilidad es de 33 a 31% y 24.1% para otras

enfermedades de tejido conjuntivo y fenómeno de Raynaud primario. No se ha reportado correlación con la actividad de la enfermedad, su presencia en fenómeno de Raynaud primario es un factor de riesgo para desarrollo de enfermedades del tejido conectivo. Los AAC están asociados con el desarrollo de manifestaciones del síndrome de CREST, pero muy poco con el desarrollo de enfermedad renal y/o pulmonar ¹⁷.

A.4. Anticuerpos anti-DNA de cadena doble (DNAcd).- Estos anticuerpos reaccionan contra DNA nativo solo o unido a histonas. La presencia de títulos altos de anticuerpos anti-DNAcd, en presencia de manifestaciones, se considera diagnóstico de LEG y correlaciona con exacerbación de la enfermedad, la cual se ve precedida por títulos altos de anticuerpos, principalmente en nefritis lúpica. El isotipo IgG tiene mayor relevancia que el IgM, pues éste último se puede incrementar en pacientes con procesos infecciosos. Su sensibilidad y especificidad depende del ensayo empleado para su detección, así como de la población en la que se realice el estudio. El ELISA convencional tiene alta sensibilidad pero baja especificidad, su empleo se recomienda para confirmación ¹³.

A.5. Anticuerpos anti-histonas.- Las histonas son proteínas catiónicas que se unen con el DNA y permiten su superestructuración formando los nucleosomas en el núcleo de células eucariotas²¹. Los anticuerpos anti-histonas se presentan en distintas patologías autoinmunes como: LEG, lupus inducido por medicamentos; así como en otras enfermedades autoinmunes órgano específicas, enfermedades neurológicas e infecciosas ¹³. Las histonas (H2A, H2B, H3, H4 y H1/H5) son blanco de anticuerpos anti-histonas y pueden ser de isotipo IgG o IgM³.

La presencia de anticuerpos anti-histonas es considerado como un proceso anormal; aunque sin utilidad clínica en términos de diagnóstico o pronóstico.

Se encuentran presentes en el 30 a 70% de los pacientes con LEG, 90 a 95% de los pacientes con lupus inducido por medicamentos, 5 a 50% de los pacientes con AR, 5 a 45% de los pacientes con escleroderma y 60 a 80% de los pacientes con cirrosis biliar primaria, dependiendo de las series estudiadas¹².

A.6. Autoanticuerpos anti-Ku y anti-Ki.- Ku es un heterodímero presente en el núcleo y nucléolo de células eucariotas. Junto con otras proteínas forma el complejo DNA-dependiente de proteincinasa (DNA-PK). La función que se ha descrito es la de prevenir la muerte celular o mutaciones provocadas por rompimiento de la cadena doble de DNA¹³.

La proteína Ki se encuentra vinculada a la regulación de la actividad proteosómica de las proteínas PA28 α y PA28 β . Aún se desconoce su función.

Se tienen pocas evidencias del papel patogénico de los autoanticuerpos anti-Ku, DNA-PKcs o anti-Ki. Los estudios muestran que su síntesis es fluctuante en pacientes con enfermedades autoinmunes¹². Los anticuerpos anti-Ku han sido reportados en el 3% de los pacientes japoneses con ES, 4% de los pacientes con ES afroamericanos y prácticamente 0% en caucasicos²². En otros estudios se han presentado prevalencias de 18% para Ku en afroamericanos y 0% para blancos con LEG²².

Los anticuerpos anti-Ki tienen una prevalencia de 18.9% en LEG, 6.7% en escleroderma, 3.3% en miositis, 8% en SS y 4% AR¹³.

B. Autoanticuerpos contra proteínas no relacionadas con la cromatina

La información genética del DNA se transcribe a RNA mensajero (RNA heterogéneo nuclear; (hnRNA). Los RNA pequeños nucleares (snRNA) como U1, U2, U4/U6, y RNA U5 están involucrados con el *splicing* o procesamiento del RNA, los cuales junto con proteínas no histonas forman las ribonucleoproteínas¹².

B.1. Autoanticuerpo anti-U₁RNP.- Son tres los polipéptidos ligados a este antígeno: U₁RNP (68 kDa), U₁RNP A (34 kD), U₁RNP C (23kD). La presencia de anticuerpos anti-U₁RNP es criterio diagnóstico para pacientes con EMTC^{12, 13}.

B.2. Autoanticuerpos anti-Sm.- El antígeno Sm, se encuentra relacionado con la estructura de RNPs. Se encuentra compuesto por ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (*small nuclear ribonucleoprotein* snRNP). Los anticuerpos anti-RNP

precipitan exclusivamente U₁RNP y reaccionan con los polipéptidos A y C de 68 y 70 KD respectivamente. Existen reacciones cruzadas entre algunos péptidos incluidos en las partículas de snRNP⁸. Los anticuerpos anti-Sm tienen una especificidad del 99 % para LEG y forman parte de los criterios diagnósticos. Algunos trabajos los correlacionan con actividad de la enfermedad. Se asocian con fenómeno de Raynaud, leucopenia, fibrosis pulmonar, pericarditis, vasculitis, nefropatía y afección neurológica¹³.

Los anticuerpos anti-RNP se detectan en un 95-100% de los pacientes con EMTC, pero no son específicos. Los pacientes con títulos altos de anticuerpos anti-Sm se presentan en el 30-50% de los pacientes con LEG, polimiositis, escleroderma y en otras enfermedades del tejido conectivo^{3, 8}.

B.3. Autoanticuerpos anti-SSA (Ro).- El antígeno SSA esta compuesto por ribonucleoproteínas que contienen ácidos nucleicos y de las cuales existen cuatro especies que se conocen como hY1, hY3, hY4 y hY5 ¹³. SSA es una proteína asociada con una variedad de snRNA transcrita por la RNA polimerasa III, el complejo protege a los RNA de la digestión por exonucleasas. Los anticuerpos anti-SSA tienen una alta especificidad clínica para ES y LEG y su presencia tiene una alta prevalencia en pacientes con síndromes de sobreposición de ambas enfermedades. Los autoanticuerpos se presentan también en pacientes con SS primario en 60-70% de los casos^{3, 6}.

B.4. Anticuerpos anti-SSB (La).- Al igual que SSA, SSB es un antígeno asociado con una amplia variedad de snRNA transcritos por la RNA polimerasa III, el complejo protege a los RNAs de la digestión por exonucleasas. Los autoanticuerpos anti-SSB se pueden detectar principalmente en pacientes con SS (25-50%) y se presentan generalmente junto con los anticuerpos anti-SSA. El papel patogénico es propio del lupus neonatal, presentándose en el 60% de las madres de dichos niños. En pacientes con LEG se puede detectar muchos años antes de la presentación clínica de la enfermedad ^{13,3}.

C. Autoanticuerpos contra componentes del nucléolo

Los anticuerpos anti-nucleolares reaccionan contra un amplio número de componentes del nucleolo. Su presencia es detectada tradicionalmente mediante IFI y se puede confirmar por inmunoprecipitación y/o ELISA. Títulos altos de anticuerpos se presentan en el suero de pacientes con ES y en otras enfermedades autoinmunes.

Estructuralmente el nucléolo se compone principalmente de²⁴:

- Centro fibrilar (CF), es el sitio donde se lleva a cabo la transcripción primaria de RNAr.
- Componente fibrilar denso (CFD), es la estructura que rodea al CF.
- Componente granular (CG), son pequeños gránulos que limitan la estructura y pueden ser identificados como componentes de transición entre CFD y el nucleoplasma circundante.
- DNA ribosomal, es la estructura que permite iniciar la formación del nucleolo durante la interfase, por lo que se le define como organizador de la región nucleolar o NOR, que da origen a los complejos de partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleolares (snRNP).

C.1. Anticuerpos anti-RNA polimerasas.- Las RNA polimerasas son enzimas que transcriben el DNA y dan lugar al RNA. Dado que ambas hebras de DNA son complementarias, teóricamente la transcripción de un segmento podría formar dos RNAm con secuencias complementarias resultando en diferentes potenciales de codificación de proteínas. Por lo general sólo una hebra da lugar a información útil cuando se transcribe a RNAm. Se conocen tres RNA polimerasas diferentes, designadas como RNAPol I; RNAPol II y RNAPol III ²¹.

- La RNA polimerasa I se encuentra en el nucléolo y es responsable de la síntesis del precursor del RNA ribosomal (28S, 5S, 8S y 18S).

- La RNA polimerasa II cataliza la transcripción de todos los genes que codifican proteínas, es decir que actúa en la producción del RNAm, produciendo también cuatro RNAs nucleares pequeños que participan en el empalme de los RNAs.
- La RNA polimerasa III, actúa fuera del nucléolo y transcribe los genes que codifican los RNAt, RNAr (5S y 8S) y una colección completa de RNA estables pequeños.

En ES frecuentemente se detectan títulos altos de anticuerpos anti-RNA-polimerasa I/III. Sin embargo, no se ha detectado evidencia de su papel patogénico; pero presenta alta especificidad y correlación con la actividad y severidad de la enfermedad, sobre todo en el tipo difuso⁸.

Los pacientes con anticuerpos anti-RNA-polimerasa III, constituyen un subconjunto de ES con engrosamiento severo y difuso de la piel, además de elevada frecuencia de involucro renal. La prevalencia reportada de los anticuerpos anti-RNA polimerasa III es de 10-15 % en pacientes con ES y 35-45% en pacientes con ESD. La presencia de los anticuerpos anti-RNA-pol-III puede ser detectada mediante IFI, EIT o ELISA³.

C.2. Anticuerpos anti Pm-Scl.- Los anticuerpos anti-PM-Scl reconocen un complejo múltiple de proteínas localizadas en el interior del CG (PM-1 α)²⁵. Representa un marcador serológico específico, con prevalencia de 24% en pacientes con sobreposición de escleroderma (Scl) y polimiositis (Pm). Su presencia se asocia con ES en un 3% y en 10% a los casos de polimiositis²⁶. Clínicamente su presencia correlaciona con un curso benigno de la enfermedad y una respuesta positiva a la terapia con esteroides³

C.3. Anticuerpos anti-U₃-RNP.- La presencia de anticuerpos anti-U₃-RNP clínicamente se ha asociado con ESD y aumento en la incidencia de hipertensión pulmonar. Los anticuerpos anti-fibrilarina pueden presentar reacción cruzada con U₃-RNP. El patrón que suele observarse mediante IFI es moteado fino, con nucleolos y citoplasma negativos, además de metafases negativas¹².

C.4. Anticuerpos anti-Th/To . - Estos anticuerpos reconocen la PRM RNAasa - procesador de RNA mitocondrial (anti-Th) y la RNAasa P (anti-To), enzimas que cortan los RNAr de 18s a 5.8s RNAr y 5.8s de 25/28 S RNAr. El antígeno Th 40/Rpp38, fue identificado como un antígeno común¹³.

La frecuencia de anticuerpos anti-Th/To es de 2-13% en pacientes con escleroderma y se asocian con síndrome de CREST, enfermedad limitada de la piel y fibrosis pulmonar. La presencia de estos autoanticuerpos correlaciona con la predisposición al desarrollo de crisis renales e incremento en la mortalidad. Son poco frecuentes en pacientes con LEG, artritis reumatoide, polimiositis y SS primario^{15, 27}.

C.5. Anticuerpos anti-NOR90.- De las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) existen dos formas moleculares que son blanco de autoanticuerpos. Pese a su baja prevalencia, los anticuerpos anti-NOR90 se han reportado en pacientes con escleroderma, LEG, AR, carcinoma hepatocelular y melanoma. El 50% de los pacientes que tienen anticuerpos anti-NOR90 circulantes desarrollan fenómeno de Raynaud¹³.

C.6. Anticuerpos anti-B23 (Nucleofosmina).- B23 es una fosfoproteína asociada a RNA que se localiza en el CG de los nucleolos. Está involucrada en el ensamble de los ribosomas y en la translocación de éstos al citoplasma. Los anticuerpos anti-B23 han sido reportados en pacientes con escleroderma, enfermedad de rechazo de injerto contra huésped y carcinomas¹³.

D. Autoanticuerpos contra antígenos relacionados con el ciclo celular

La diferencia en patrones e intensidades de la tinción nuclear de células HEp-2 en la técnica de IFI indica la presencia de autoanticuerpos, los cuales muestran cambios en cantidad, localización y reconocimientos de estructuras moleculares, los cuales dependen a su vez de los antígenos del ciclo celular que reconozcan³.

D.1. Anticuerpos contra antígenos nucleares de células en proceso de proliferación (PCNA)

Los antígenos, que reconocen los anticuerpos anti-PCNA, son proteínas asociadas a las polimerasas de DNA que promueven la polimerización eficaz de éste. Por ello se

observa tinción en células que se encuentran en la fase de síntesis, reparación y regulación del ciclo celular. La especificidad de los anticuerpos anti-PCNA es poco conocida, pero su presencia debe alertar al clínico sobre un LEG definido o en evolución¹³.

E. Autoanticuerpos contra antígenos relacionados con la membrana nuclear

La membrana nuclear es una bicapa lipídica, la porción interna está conectada con la lámina nuclear. La porción externa tiene contacto con los ribosomas y con el retículo endoplásmico. La membrana nuclear se encuentra perforada por múltiples poros nucleares a través de los cuales ocurre el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma²¹.

E.1. Anticuerpos anti-lamininas.- Las lamininas son proteínas ácidas conocidas como: laminina A (74kD), laminina B (68kD) y laminina C (60kD), las cuales están revestidas por un filamento intermedio. Los anticuerpos anti-lamininas se pueden detectar en pacientes con cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, síndrome de fatiga crónica y hepatitis viral D¹³.

E.2. Anticuerpos contra el complejo de los poros de la membrana nuclear.- El principal epítipo que reconocen éstos anticuerpos es la glicoproteína organizadora del poro nuclear de 210 kD (gp210), el cual se localiza en el extremo citoplásmico. Se presentan principalmente en pacientes con CBP¹³.

3.4.2. Autoanticuerpos contra componentes citoplásmicos

A. Anticuerpos anti-proteínas P-ribosomales

Estos anticuerpos reconocen tres proteínas ribosomales específicas: P0, P1 y P2 localizadas en la subunidad mayor del ribosoma. Anticuerpos contra proteínas P ribosomales se presentan específicamente en LEG durante los períodos de activación de la enfermedad y con manifestaciones renales, neuropsiquiátricas y hepáticas¹³.

Estos autoanticuerpos pueden presentar asociación con anticuerpos anti-Sm y/o anti-DNA, probablemente debido a reactividad cruzada. Su prevalencia es influenciada por variaciones étnicas, siendo común en asiáticos.

B. Anticuerpos anti-mitocondriales (AMA)

Los anticuerpos anti-mitocondriales se consideran marcadores serológicos de cirrosis biliar primaria (CBP) ya que se detectan en el 90 al 95% de los individuos afectados.

Su reacción es específica contra componentes del complejo enzimático 2-oxo-acido deshidrogenasa, localizado en la membrana interna de la mitocondria.

Las técnicas de detección presentan diversa sensibilidad y especificidad, por lo que su hallazgo o ausencia mediante IFI deberá ser confirmada por EIT o ELISA, los cuales tienen una sensibilidad mayor a 90% y especificidad de 98%. No se ha demostrado su papel patogénico, directo o indirecto en la CBP; por lo que si bien constituyen uno de los tres criterios diagnósticos para dicha enfermedad no predicen el fenotipo clínico ni el pronóstico del paciente¹³.

C. Anticuerpos anti-Jo-1

Estos anticuerpos pertenecen al grupo de anticuerpos anti-aminoacil-RNAt sintetasa. Es considerado como autoanticuerpo específicos de miositis (AEM). El antígeno es requerido para la síntesis proteica. Mediante IFI se observa principalmente en su forma citoplásmica¹³. Anti-Jo-1 ha sido principalmente asociado con miositis y enfermedad pulmonar intersticial. Se ha podido observar cierta correlación entre la actividad de la enfermedad y el título del anticuerpo, usualmente no es empleado para calificar la actividad de la enfermedad¹³.

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El empleo de IFI sobre células HEp-2 es un recurso ampliamente difundido como método de tamizaje para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes en general.

La revisión de la extensa literatura; nos muestra que si bien este recurso es valioso, no resulta determinante y requiere de exámenes de mayor especificidad y sensibilidad, tales como ELISA, EIT, RIA, LIA, para la confirmación de la presencia de los posibles autoanticuerpos presentes que se expresan a través de los distintos patrones expresados.

Los distintos patrones pueden indicarnos la presencia de un determinado grupo de autoanticuerpos en el suero a estudiar. Si bien los anticuerpos están dirigidos contra las estructuras celulares; no son los mismos para las diferentes enfermedades autoinmunes y así tampoco para los distintos subtipos de esclerodermia.

Los diferentes autoanticuerpos presentes se deben no sólo a los distintos tipos de patologías desarrolladas; sino, como ya se menciono, tienen cierta influencia genética, presentando variaciones de una población a otra; de donde resulta la importancia de la determinación de su prevalencia en población la mexicana.

V. JUSTIFICACIÓN.

La escleroderma es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida y origen multifactorial en la que intervienen factores genéticos, ambientales y hormonales que llevan al desarrollo de alteraciones en múltiples órganos.

El desarrollo de anticuerpos que reconocen múltiples autoantígenos es una característica de la enfermedad y muestra la des-regulación del sistema inmunológico.

La detección de los autoanticuerpos específicos asociados a la escleroderma y su posible relación con las manifestaciones clínicas, así como la extensión del daño, permiten optimizar la evaluación periódica de cada paciente, alertando al clínico para seguir más de cerca a los pacientes de mayor riesgo, optimizando con ello costos de diagnóstico y tratamiento.

Los antígenos pueden sufrir modificaciones por los procesos de purificación, presencia de SDS-poliacrilamida, también pueden haber diferencias en los conjugados IgG específicos usados por las casas comerciales, por lo que la detección de autoanticuerpos presentes en los sueros de pacientes podría presentar diferencias de un método a otro. Por ello, en el presente trabajo se estudió la reactividad de los sueros de los pacientes con escleroderma mediante tres métodos:

1. IFI utilizando como sustrato células HEp-2.
2. ELISA, de segunda y tercera generación que aumentan la sensibilidad especificada y la posibilidad de cuantificar la concentración de autoanticuerpos.
3. EIT para confirmar la especificidad de los autoanticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con escleroderma.

VI.HIPÓTESIS.

Los pacientes mexicanos con esclerodermia presentan prevalencia de autoanticuerpos asociados a la enfermedad diferente a la reportada en poblaciones asiática, caucásica y negra.

La identificación de anticuerpos, junto con la asociación y correlación de éstos con los subtipos de escleroderma permitirá apoyar al diagnóstico temprano y oportuno.

VII. OBJETIVOS.-

Principal

- Determinar la presencia y frecuencia de autoanticuerpos presentes en los pacientes con diagnóstico de escleroderma que se atienden en el INCMNSZ.

Específicos

- Determinar la asociación y/o posible correlación entre los autoanticuerpos, presentes en las muestras de dichos pacientes, y el subtipo de escleroderma que presentan.
- Comparar los diferentes métodos de detección de anticuerpos (IFI, ELISA y EIT) con los sueros de pacientes con escleroderma, que tienen en circulación autoanticuerpos que reaccionan contra componentes nucleares y citoplásmicos.

VIII MATERIAL Y MÉTODOS.

8.1. Pacientes:

Se invitó a participar a los pacientes con esclerodermia, que se atienden en el Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ y que forman parte de la cohorte de escleroderma (120 pacientes).

8.2. Muestras:

Se tomaron 7 ml de sangre venosa sin anticoagulante, se separó el suero y se congeló a -70 °C hasta su uso.

8.3. Detección de autoanticuerpos:

1. Tamizado inicial. Realizado mediante inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato células HEp-2.
2. Identificación de la especificidad. Se realizó mediante dos técnicas inmunoenzimáticas:

ELISA para los autoantígenos: CENP-B, SS-A, SS-B, RNP, Sm, Scl-70, DNAd, DNAs, Histonas, Nucleomas, Jo-1.

EIT para los autoantígenos: U1-RNP, Sm, SS-A, SS-B, Pm/Scl, Centrómero, Scl-70, Ku, proteínas P ribosomales, AMA-2 y Jo-1.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).- Se siguió el procedimiento aplicado en el laboratorio de inmunología de INCMNSZ de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (The Binding Site), el cual se describe a continuación:

El sustrato, células HEp-2 fijadas con alcohol a laminillas, se incubó por 20 minutos con 20 µl de suero de los pacientes (dilución 1:40), calibradores (diluidos con amortiguador 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560 y 1:5120), controles (positivo y negativo), en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se prosiguió con lavado por triplicado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) durante 5 minutos con

agitación constante. Los anticuerpos unidos a los antígenos se evidenciaron con un segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se incubó durante 20 minutos y se procedió con un segundo ciclo de lavados. La unión de los anticuerpos de conejo a los anticuerpos humanos presentes en los sueros de los pacientes producen en las células HEp-2 patrones de distribución que se observaron en el microscopio de epifluorescencia.

Las laminillas fueron leídas por tres observadores experimentados con un coeficiente de correlación interobservador mayor a 0.8³².

Para la lectura de las laminillas, se consideraron resultados positivos en función del patrón y título de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 3³²

Patrón		Positivo
Nuclear	Homogéneo	>1:40
	Periférico	>1:40
	Laminar nuclear	>1:40
	Centromérico	>1:40
	Centriolar	>1:40
	Moteado grueso	>1:160
	Moteado fino	>1:160
Ciclo celular	Nucleolar	>1:40
	NuMA-1	>1:40
	NuMA-2	>1:40
	Centriolar	>1:40
Citoplásmico	Citoplásmico	>1:80
	Mitocondrial	>1:160
	Aparato de Golgi	>1:40
	Citoesqueleto	>1:160
Cualquier otro patrón		>1:40
Fuente: Rosas I., Gomez E.I, Núñez-Álvarez C.A, Huerta M.T, Alvarado A., Cabiedes J.; Referencia de puntos de corte. Prevalencia de anticuerpos anti-nucleares (ANN) en donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Rev Mex Reumatol 2005; 20(1):159.		

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).- Las muestras fueron procesadas en el equipo automatizado DSX (DYNEX Technologies), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (The Binding Site y Orgentec). Una vez creados y probados los programas para cada prueba, se dispusieron los reactivos y el material necesario. El proceso de manera general consistió en:

- Dilución y homogeneizado de muestras en placas de pozo profundo.
- Adición a placas sensibilizadas con el antígeno de calibradores, controles y muestras, diluidas previamente.
- Incubación de las placas a temperatura ambiente (21-23 °C).
- Lavado triple.
- Adición e incubación del conjugado anti-IgG humana marcada con peroxidasa, a temperatura ambiente.
- Nuevo ciclo de lavados.
- Adición del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e incubación a temperatura ambiente.
- Adición de solución de paro, incubación a temperatura ambiente, agitación de placa por 3 segundos y lectura a 450 nm.

Los intervalos de referencia en el caso de DNACd, DNACs, nucleosomas e histonas fueron tomados de estudios previos realizados en el INN CMSZ³³. Los valores normales de anticuerpos anti-RNP, Sm, Jo-1, centrómero y Scl-70 fueron tomados de las casas comerciales.

Electroinmunofluorescencia (EIT). Se emplearon los reactivos provistos por la casa comercial (EUROIMMUNE), así como las tiras con antígenos de células HEP-2 separados mediante electroforesis. El procedimiento se describe brevemente a continuación:

- En un primer paso se bloquearon los sitios inespecíficos, mediante incubación de las tiras de nitrocelulosa que contienen los antígenos de células HEP-2, por 15 minutos con amortiguador. Al término del bloqueo se aspira todo el líquido.
- Se pusieron las tiras en contacto con la muestra diluida (1:51) y se incubaron durante 60 minutos.
- Se eliminó la solución y enjuagaron las tiras 3 veces por 5 minutos con amortiguador en agitación.

- Se agregó el conjugado enzimático (anti IgG humana unido a fosfatasa alcalina) y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente con agitación leve constante.
- Nuevo ciclo de lavados.
- Se incubaron las tiras y sustrato NBT/BCIP durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación.
- La reacción fue interrumpida mediante aspirado del sustrato y lavado triple con agua destilada des-ionizada.
- Se retiró el exceso de humedad.
- Se procedió a la lectura de tiras en busca de bandas específicas de reconocimiento mediante comparación con tira control.
- La interpretación de resultados se realizó por duplicado.

8.4. Análisis estadístico.- El análisis de datos se realizó mediante estadística descriptiva y análisis de correlaciones, como una medida del grado de covariabilidad entre dos variables, empleando para ello el coeficiente de correlación de Pearson, con la ayuda del programa SPSS 15.0

IX RESULTADOS.

De los 120 pacientes estudiados 108 (90%), fueron mujeres y 12 (10%), fueron hombres (tabla 4).

El promedio de edad de fue de 46 ± 14 años (mínima 17 y máxima 80 años) y moda de 60 años.

Tabla 4. Distribución por género

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Mujeres	108	90.0
Hombres	12	10.0
Total	120	100.0

- La distribución de sexo según el tipo de escleroderma diagnosticada se resume en la tabla 5:

Tabla 5

Género	Esclerodermia (%)							
	Difusa	Limitada	Limitada / EMTC	Limitada/ CBP	Limitada/ Miopatía	Limitada/Vas Colangiopatía	Limitada/ Morfea	Limitada/ LEG
Femenino	36.0	40.0	2.8	4.6	2.8	0.9	0.9	0.9
Masculino	75.0	8.3	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

- La edad promedio de inicio de la enfermedad fue de 36 años, mínima 9 y máxima 64 años
- La distribución de edad, inicial y actual, según el tipo de esclerodermia diagnosticada se resume en la tabla 6:

Tabla 6

Edad	Subtipo de escleroderma (años)							
	Difusa	Limitada	Limitada / EMTC	Limitada/ CBP	Limitada/ Miopatía	Limitada/Vas- Colangiopatía	Limitada/ Morfea	Limitada/ LEG
Inicio	35.0	35.6	35.4	44.2	33	53.0	56.5	20.5
Actual	43.2.0	48.1	49.3	62.6	35.6	55.0	62	25.0

- En cuanto a los subtipos de escleroderma las frecuencias observadas, en las 120 muestras, la distribución fue: 47 (39.2%) tuvieron la forma difusa y 73 (60.8%) la forma limitada. De los 73 pacientes con la forma limitada; 44 (60%) fueron clasificados como: ESL, 18 (24.7%) presentaron además manifestaciones clínicas de EMTC, 5 (6.9%) de cirrosis biliar primaria (CBP), 3 miopatía (MPT) (4.1%), 1 (1.4%) morfea, 1 (1.4%) colangiopatía-vasculitis y 1 (1.4%) LEG (Tabla 7).

Tabla 7: Distribución de Pacientes con Esclerodermia.

Tipo de Esclerodermia	N° de pacientes	Porcentaje
Difusa	47	39
Limitada	44	37
Con EMTC	18	15
Con CBP	5	4.2
Con Miopatía	3	2.5
Solo con morfea	1	1.4
Con Colangiopatía y vasculitis	1	1.4
Con LEG	1	1.4
Fuente: Elaboración propia		

- La detección de anticuerpos anti-nucleares detectados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) permitió la identificación de patrones resumida

en la tabla 8 junto con la prevalencia de patrones según el subtipo de enfermedad.

Tabla 8. Patrones de AAN detectados mediante IFI, en pacientes con esclerodermia

Patrón	Subtipo de esclerodermia	Prevalencia (%)
Homogéneo (H)	Difusa	36.2
	Limitada	27.3
	Limitada y EMTC	23.5
	Limitada, Colangiopatía y vasculítis	100.0
	Limitada y LEG	100.0
Moteado grueso (MG)	Difusa	21.3
	Limitada	31.8
	Limitada y CBP	20.0
	Limitada y EMTC	12.0
	Limitada y Miopatía	33.3
	Limitada, solo Morfea	100.0
Moteado fino (MF)	Difusa	19.0
	Limitada	25.0
	Limitada y CBP	20.0
	Limitada y EMTC	47.0
	Limitada y Miopatía	33.3
Centromérico	Difusa	17.0
	Limitada	41.0
	Limitada y CBP	100.0
	Limitada y EMTC	17.0
	Limitada, solo Morfea	100.0
Nucleolar	Difusa	19.0
	Limitada	7.0
	Limitada y EMTC	5.8
	Limitada Miopatía	33.3
Th/To	Difusa	8.5

	Limitada	7.0
	Limitada CBP	20.0
	Limitada EMTC	6.4
	Limitada Miopatía	33.3
Citoplásmico	Difusa	25.5
	Limitada	20.5
	Limitada y CBP	20.0
	Limitada y EMTC	47.0
	Limitada y Miopatía	33.3
Citoplásmico granular	Difusa	8.5
	Limitada	11.4
	Limitada, solo Morfea	100.0
	Limitada, Colangiopatía y vasculitis	100.0
Mitocondrial	Difusa	10.5
	Limitada	13.6
	Limitada y CBP	60.0
Fuente: Elaboración propia.		

Todos los pacientes con diagnóstico de ES difusa tuvieron anticuerpos anti-nucleares positivos, de los cuales: 36.2% presentaron un patrón homogéneo con títulos entre 1:1280 y 1:5120; 21.3% moteado grueso con títulos entre 1:320 y 1:5120; 19.0 % moteado fino con títulos entre 1:160 y 1:5120; 17.0% anti-centrómero con títulos entre 1:640 y 1:5120; 19.0 % anti-nucleolo con títulos entre 1:640 y 1:5120; 8.5% anti-Th/To con títulos entre 1:320 y 1:5120.

En cuanto a los patrones citoplásmicos, 34% de los pacientes con ES difusa presentaron además de un patrón nuclear, patrones citoplásmicos distribuidos de la siguiente forma: 25.5% citoplásmico homogéneo entre títulos de 1:80 y 1:1280, 8.5% citoplásmico granular con títulos entre 1:40 y 1:160; 10.5% mitocondrial con títulos entre 1:160 y 1:1280.

Todos los pacientes con ES limitada tuvieron anticuerpos anti-nucleares positivos, de los cuales: 27.3% presentaron un patrón homogéneo con títulos entre 1:640 y 1:5120;

31.8% moteado grueso con títulos entre 1:160 y 1:2560; 25.0% moteado fino con títulos entre 1:320 y 1:5120; 41.0 % patrón centromérico con títulos entre 1:320 y 1:2560; 7% anti-Th/To con títulos entre 1:320 y 1:5120. En cuanto a los patrones citoplásmicos, 45.5% de los pacientes con ES limitada presentaron además de un patrón nuclear, patrones citoplásmicos con las siguientes prevalencias: 20.5% citoplásmico homogéneo con títulos entre 1:80 y 1:1280, 11.4 % citoplásmico granular con títulos entre 1:80 y 1:320; 13.6% mitocondrial con títulos de 1:160 a 1:640.

Los pacientes con ES limitada y manifestaciones clínicas de EMTC, el 23.5% tuvieron patrones homogéneos con títulos entre 1:2560 y 1:5120; 12% moteado grueso con títulos entre 1:1280 y 1:2560; 47.0 % moteado fino con títulos entre 1:160 y 1:5120; 17% centromérico con títulos entre 1:640 y 1:2560; 5.8% nucleolar 6.4% anti-Th/To con títulos entre 1:320 y 1:5120. En cuanto a los patrones citoplásmicos observados, 47.0 % de los pacientes con ES limitada y manifestaciones clínicas de EMTC, todos los sueros dieron patrón citoplásmico homogéneo a títulos entre 1:80 y 1:320.

Los sueros de los pacientes con ES limitada y CBP presentaron la siguiente distribución de patrones nucleares: 20.0 % expresaron patrón moteado grueso con título de 1:1280; 20.0 % moteado fino con título de 1:2560; 100 % patrón centromérico con títulos entre 1:320 y 1:5120; 20.0 % patrón Th/To y 20% patrón centriolar. En cuanto al reconocimiento de los antígenos citoplásmicos, el 80% de los sueros de los pacientes con ES limitada y CBP tuvieron anticuerpos anti-citoplásmicos de los cuales 20.0 % dieron patrón citoplásmico homogéneo con título 1:640 y 60% patrón mitocondrial con títulos de 1:320 y 1:640.

El estudio de los sueros de pacientes con ES limitada y miopatía (n=3) mostró que un suero presentó un patrón moteado grueso con título de 1:2560, otro un patrón moteado fino 1:320 y el tercero patrón nucleolar 1:5120. Solo un suero presentó un patrón citoplásmico homogéneo 1:160.

El paciente con ES limitada con colangiopatía y vasculitis presentó un patrón homogéneo 1:5120 junto con un patrón citoplásmico granular 1:160.

El paciente con ES limitada y morfea presentó un patrón centromérico 1:640 con moteado grueso 1:320 y citoplásmico granular 1:80.

El suero del paciente con ES limitada y manifestaciones clínicas de LEG presentó un patrón homogéneo 1:2560 junto con patrón citoplásmico homogéneo 1:40, cuya dilución se considera como negativa³².

- Las frecuencias de anticuerpos específicos detectados mediante ELISA, según el tipo de escleroderma, se muestran en la tabla 9

Tabla 9. Reactividad de sueros de pacientes con diagnóstico de esclerodermia, contra antígenos nucleares y citoplásmicos determinados por ELISA.

Antígeno	Esclerodermia	Nº	Prevalencia (%)
Scl-70	Difusa	22	46.8
	Limitada	8	18.2
	Limitada y EMTC	1	5.9
	Limitada, colangiopatía y vasculitis	1	100.0
	Limitada y LEG	1	100.0
RNP/Sm	Difusa	7	15.0
	Limitada	4	9.0
	Limitada y EMTC	15	88.2
Sm	Difusa	2	4.3
	Limitada y EMTC	6	35.5
SS-A	Difusa	11	23.4
	Limitada	9	20.5
	Limitada y CBP	2	40.0
	Limitada y EMTC	5	29.4
	Limitada, Colangiopatía y Vasculitis	1	100.0
	Limitada y Miopatía	1	33.0
SS-B	Difusa	4	8.5
	Limitada	1	2.3
DNAcd	Difusa	37	78.7
	Limitada	26	61.4
	Limitada y CBP	4	80.0
	Limitada y EMTC	14	82.4
	Limitada, solo Morfea	1	100.0
	Limitada y LEG	1	100.0
DNAcs	Difusa	4	8.5
	Limitada y EMTC	5	29.4
Nucleosomas	Difusa	22	47.0
	Limitada	10	22.7

	Limitada y CBP	1	20.0
	Limitada y EMTC	10	59.0
	Limitada, colangiopatía y vasculitis	1	100.0
	Limitada y miopatía	1	100.0
	Limitada y LEG	1	100.0
Histonas	Difusa	2	4.3
	Limitada	4	9.1
	Limitada y EMTC	3	17.6
CENP-B	Difusa	9	19.0
	Limitada	18	41.0
	Limitada y CBP	5	100.0
	Limitada y EMTC	2	11.8
	Limitada, solo Morfea	1	100.0
Jo-1	Limitada	1	2.3
	Limitada y EMTC	1	6.0
Fuente: Elaboración propia.			

El 46.8 % de los sueros de los pacientes con ES difusa tuvieron reactividad contra el antígeno Scl-70, es decir 22 casos, de los cuales 14 expresaron patrón homogéneo; 15.0 % contra RNP/Sm (7 casos, de los cuales 2 expresaron patrón MG y 2 patrón MF), 4.0 % contra Sm (2 casos, de los cuales 1 expresó patrón MF), 23.0 % contra SS-A (11 casos de los cuales 2 expresaron patrón MG y 3 patrón MF), 8.5% contra SS-B (4 casos en total, de los que 1 expresó un patrón MG y 1 patrón MF), 79.0 % contra DNACd (37 casos en total de los cuales: 8 expresaron patrón MG, 3 con metafase delineada; 5 casos de los 37 expresaron MF y 1 sólo de estos últimos metafase delineada; 4 muestras del total de casos con DNA positivos expresaron patrón homogéneo), 8.5% contra DNACs (4 casos en total, de los cuales 1 expresó patrón MF), 47% contra nucleosomas (de los 22 casos, 10 expresaron patrón homogéneo), 4.3% contra histonas (2 casos de los cuales 1 expresó patrón MF con metafase delineada) y 19% contra la proteína del centrómero CENP-B (de los 9 casos, 7 expresaron patrón centromérico).

El estudio de los sueros de pacientes con ES limitada mostró que el 18% tiene anticuerpos contra Scl-70 (de los 8 casos positivos para Scl-70, 7 expresaron patrón homogéneo), 9% contra RNP/Sm (4 casos en total de los cuales 3 expresaron patrón

MF), 21% contra SS-A (equivalentes a 9 casos de los cuales 2 presentaron el patrón MG y 3 como MF), 2% contra SS-B (caso único el cual presentó un patrón MG), 61% contra DNAcd (27 casos de los que 8 presentaron patrón homogéneo; 9 MG con metafase negativa, 5 MF de los cuales 4 presentaron además metafase delineada), 23% contra nucleosomas (10 casos de los cuales 6 se presentaron patrón homogéneo, 2 MG y 2 MF), 9 % contra histonas (4 casos de los cuales 2 presentaron patrón Homogéneo, 1 MG con metafase delineada y 1 como MF con metafase delineada), 41% contra CENP-B (18 casos, de los cuales 16 expresaron patrón centromérico) y 2% reconoció Jo-1.

Los sueros de los pacientes con ES limitada y manifestaciones clínicas de EMTC mostraron las siguientes reactividades: 6% reconocieron Scl-70 (único caso, el cual presentó patrón H), 88% RNP/Sm (15 casos de los cuales 1 expreso patrón MG y 8 MF), 36% Sm (6 casos, de los que 1 presentó patrón MG y 4 MF), 29% SS-A (5 casos de los cuales 3 presentaron patrón MF), 82% DNAcd (14 casos de los cuales 4 presentaron patrón H, 2 patrón MG y 5 patrón MF con metafase delineada), 29% DNACs (5 casos, de los cuales 2 presentaron patrón H, 2 MG y 1 MF con metafase delineada), 59% nucleosomas (10 casos de los que 2 presentaron patrón H), 18% histonas (3 casos, de los cuales 2 presentaron patrón MG y 1 MF con metafase delineada), 12% CENP-B (2 casos, ambos dieron un patrón centromérico) y 6% Jo-1 (un solo caso el cual dio un patrón Jo-1 nucleolar).

Los sueros de pacientes con ES limitada y CBP mostraron reactividad contra SS-A (40%, 2 casos que no se expresaron como MG o MF), DNAcd (80%, 4 casos de los cuales 1 presentó un patrón MG), nucleosomas (20%, caso único expresado como patrón H) y todos tuvieron anticuerpos anti-CENP-B (5 casos y todos dieron patrón centromérico).

El 33% de los sueros de pacientes con ES limitada y miopatía tuvieron reactividad contra SS-A (un solo caso, el cual presentó un patrón MF) y 33% reaccionaron contra nucleosomas.

El suero del paciente con ES limitada, colangiopatía y vasculitis mostró reactividad contra Scl-70, SS-A y nucleosomas y dio un patrón Homogéneo por IFI.

El suero del paciente con ES limitada con morfea, mostró reactividad contra CENP-B y DNACd, y dio una combinación de patrones MG con centromérico.

El suero del paciente con ES limitada y manifestaciones clínicas de LEG reaccionó contra Topoisomerasa I (Scl-70), DNACd y nucleosomas, y dio un patrón homogéneo.

- La presencia de anticuerpos, presentes en pacientes con esclerodermia, contra antígenos específicos detectados mediante EIT se resume en la tabla 10.

Tabla 10. Reactividad de sueros de pacientes con escleroderma contra antígenos nucleares y citoplásmicos detectada mediante EIT.

Antígeno	Esclerodermia	Nº	Prevalencia (%)
U1-nRNP	Difusa	12	25.5
	Limitada	10	22.7
	Limitada CBP	2	40.0
	Limitada/EMTC	8	47.0
Sm	Difusa	7	15.0
	Limitada	5	11.4
	Limitada con CBP	2	40.0
	Limitada y EMTC	4	23.5
	Limitada y LEG	1	100.0
SS-A	Difusa	22	46.8
	Limitada	24	54.5
	Limitada con CBP	5	100.0
	Limitada con EMTC	11	64.7
	Limitada y miopatía	2	67.0
	Limitada, colangiopatía y vasculitis	1	100.0
	Limitada solo con morfea	1	100.0
SS-B	Difusa	3	6.4
	Limitada	3	7.0
	Limitada y EMTC	1	5.8
PM-Scl	Difusa	11	23.4
	Limitada	11	25.0
	Limitada EMTC	1	5.8
	Limitada y miopatía	1	33.0
Centrómero	Difusa	13	28.0
	Limitada	19	43.2
	Limitada y CBP	5	100.0
	Limitada y EMTC	5	29.4
	Limitada y miopatía	1	33.0
	Limitada solo con morfea	1	100.0
Scl-70	Difusa	18	38.3

	Limitada	13	29.5
	Limitada y CBP	2	40.0
	Limitada y EMTC	2	11.8
	Limitada y LEG	1	100.0
Ku	Difusa	14	30.0
	Limitada	16	36.4
	Limitada y CBP	4	80.0
	Limitada y EMTC	8	47.0
	Limitada y miopatía	3	100.0
	Limitada, solo con morfea	1	100.0
Proteínas P ribosomales	Difusa	21	23.4
	Limitada	17	38.6
	Limitada y CBP	4	80.0
	Limitada y EMTC	10	59.0
	Limitada y miopatía	2	67.0
M2	Difusa	5	10.6
	Limitada	8	18.2
	Limitada y CBP	1	20.0
	Limitada y EMTC	3	17.6
Jo-1	Difusa	6	12.8
	Limitada	6	16.0
	Limitada y CBP	2	40.0
	Limitada y EMTC	5	29.4
	Limitada y miopatía	2	67.0

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de la reactividad de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con ESD contra antígenos específicos mostró que el 26.0 % de los sueros reconocieron antígeno U₁-RNP (de 12 casos positivos 2 dieron un patrón MG; 3 dieron patrón MF), 15.0% reaccionó contra Sm (7 casos positivos. Uno dio un patrón MG y 3 dieron patrón MF), 47.0 % reconocieron SS-A (de los 22 casos 3 dieron patrón MG y 5 MF), 6.4 % reconocieron SS-B (3 casos, de los cuales 1 dio un patrón MG y 1 MF), 23% reconocieron el antígeno PM-Scl (2 de los 11 casos dieron un patrón nucleolar), 28% reconocieron CENP-B (13 casos, de los cuales 8 dieron patrón centromérico), 38.3 % reconocieron Scl-70 (10 muestras de suero dieron patrón homogéneo, tres de ellos reconocieron componentes del nucleolo con tinción fuerte y tres sueros reconocieron componentes de la cromatina con un patrón difuso en la metafase), 30.0 % reconocieron al antígeno Ku (14 casos, de los cuales 6 dieron patrón MG), 23.4 % reconocieron a las proteínas P ribosomales (21 casos, de los cuales 7 dieron un patrón

citoplásmico), 12.8 % de los sueros reconocieron el antígeno Jo-1 y no dieron un patrón nuclear o citoplásmico específicos y 10.6 % reconocieron al antígeno M2 (5 casos, de los cuales 2 dieron patrón mitocondrial).

El análisis de los sueros de los pacientes con ESL mediante EIT mostró las siguientes reactividades: el 23.0% de los sueros reconoció la banda de U1-nRNP (10 casos, de los cuales 3 dieron patrón MG y 3 MF), 11.0 % reconocieron la banda de Sm (5 casos, de los cuales 2 dieron patrón MG y 3 MF), 55% de las muestras reconocieron la banda de SS-A (24 casos, de los cuales 7 dieron patrón MG y 7 MF), 7.0 % de las muestras reconocieron la banda de SS-B (3 casos, de los que 1 dio patrón MG y 1 MF), 25.0% reconocieron la banda de PM-Scl (11 casos, de los cuales 2 dieron patrón nucleolar), 43.0% reconocieron las bandas de las proteínas del centrómero (19 casos positivos de los cuales 16 dieron patrón centromérico), 30.0% reconocieron la banda de Scl-70 (13 casos, de los cuales 5 dieron patrón homogéneo), 36.0% reconocieron la banda del antígeno Ku (16 muestras, de las cuales 6 dieron patrón MG), 39.0 % de las muestras reconocieron las proteínas P ribosomales (de las 17 muestras que reconocieron las proteínas P-ribosomales solo 3 dieron un patrón citoplásmico). Finalmente, el 18.0% de las muestras reconocieron el antígeno M2 mitocondrial (8 casos positivos, de los cuales 3 dieron patrón mitocondrial) y el 16.0% de las muestra reconocieron la banda de Jo-1 (ningún suero dio el patrón específico).

Los pacientes con ES limitada y sobreposición de EMTC mostraron en un 47 % de las muestras reconocimiento de U₁-RNP (8 casos, de los cuales 1 dio patrón MG y 5 MF), 23 % reconocieron la banda de Sm (4 casos, de los cuales 2 dieron patrón MF), 65% reconocieron la banda de SS-A (11 casos, de los cuales 1 dio patrón MG y 4 MF), 5.8% reconocieron la banda de SS-B (un sólo caso, el cual no dio el patrón propio del autoanticuerpo), 5.8% reconocieron la banda Pm/Scl, en tanto que 29% reconocieron proteínas del centrómero (5 casos, de los cuales 3 dieron patrón centromérico), 11.8% reconocieron Scl-70 (2 casos, de los cuales uno dio patrón homogéneo), 47.0% reconocieron el antígeno Ku (8 casos, de los cuales 2 dieron patrón MG), 59.0% reconocieron proteínas P-ribosomales (10 casos, de los cuales 5 dieron patrón citoplásmico), 29.0% reconocieron la banda de Jo-1 (5 sueros, de los cuales 2 dieron

patrón Jo-1 nucleolar) y 18.0% reconocieron el antígeno mitocondrial M2 (3 casos, de los cuales ninguno expresó patrón mitocondrial).

Los sueros de los pacientes con ES limitada y CBP reaccionaron contra los siguientes antígenos: el 40.0 % de los sueros reconoció U1-nRNP (2 casos, de los cuales uno dio patrón MG y otro MF), 40.0 % Sm (2 casos, de los cuales 1 dio patrón MF), todas las muestras reaccionaron contra la banda de SS-A (5 muestras, de las cuales 1 dio patrón MF), en tanto que ninguna muestra reconoció SS-B ni PM-Scl. Proteínas del centrómero fueron reconocidas por todas las muestras (5 casos, todos dieron patrón centromérico), en tanto que el 40.0% reconoció la banda de Scl-70 (2 casos, de cuales ninguno expreso patrón homogéneo), 80.0% el antígeno Ku (4 casos, de los cuales 1 dio patrón MG), el 80.0% reaccionó contra las proteínas P-ribosomales (4 casos, de los cuales 1 dio patrón citoplásmico), el 40 % de los sueros reconoció Jo-1 (sin expresión del patrón específico) y 20% antígeno mitocondrial M2 (un caso, el cual dio patrón mitocondrial).

Entre los sueros de pacientes con ES limitada y miopatía, 67% reconocieron la banda de SS-A (2 casos, de los cuales 1 dio patrón MG), en tanto que el 33.0% reaccionó contra el antígeno PM-Scl (un solo caso, el cual dio patrón nucleolar) y 33.0 % contra proteínas del centrómero (un caso el cual dio patrón centromérico). Así mismo, todos los sueros reconocieron el antígeno Ku (3 casos, de los cuales 1 dio patrón MG y 1 dio MF) y solo el 67.0% reaccionó contra proteínas P-ribosomales (2 casos, de los cuales 1 dio patrón citoplásmico) y 67.0 % contra el antígeno Jo-1(2 casos, de los cuales ninguno dio el patrón específico del reconocimiento del antígeno).

El suero del paciente con diagnóstico de ES limitada, colangiopatía y vasculitis sólo reconoció SS-A y dio patrón homogéneo.

Por otro lado, el suero del paciente con diagnóstico de ES limitada/morfea mostró reactividad contra SS-A, CENP-B y antígeno Ku. Mediante IFI dio patrón centromérico acompañado de MG.

El caso del paciente con ES limitada y LEG, el suero del paciente reconoció la banda de antígeno Scl-70 y Sm. Expresando en IFI patrón H.

- El análisis de las correlaciones existentes entre los diversos patrones observados mediante IFI y la caracterización específica de antígenos mediante ELISA y EIT se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Correlaciones observadas entre patrones de IFI y reactividades específicas de los AAN presentes en pacientes con escleroderma.

Patrón	Antígeno específico	ES. difusa	ES limitada	ESL/EMTC	ESL/CBP	ESL/MPT
Homogéneo (H)	Scl-70 (ELISA)	0.536**	0.637**			
	Scl-70(EIT)	0.318*				
M. grueso (MG)	Prot.P ribosomal		0.460**			
	Jo-1	0.426**				
	Ku	0.343*				
	M2	0.326*				
M. fino (MF)	SS-A(ELISA)					1**
	RNP/Sm		0.365*			
	Jo-1(EIT)		0.303*			
C.granular	Scl-70(ELISA)		0.760**			
	Scl-70(EIT)	0.325*				
Mitocondrial	M2	0.329*	0.328*			
Peroxisomas	DNAcs	0.483**				
	SS-B	0.352*				
Centromérico	Centrómero (EIT)	0.787**	0.812**	0.789**		
	CENP-B (ELISA)		0.768**	0.717**		
Nucleolar	PM/Scl					1**

Fuente: Elaboración propia

*Correlación significativa a nivel 0.01 (bilateral)

**Correlación significativa a nivel 0.05 (bilateral)

El análisis de las correlaciones, con significancia estadística, entre los autoanticuerpos presentes en pacientes con escleroderma y los patrones observados en IFI, mostró en el caso de la ES difusa la existencia de correlación de 0.536 ($p < 0.01$) entre el patrón

homogéneo y anticuerpos anti-Scl-70 detectado por ELISA y de 0.318 ($p < 0.05$) detectado por EIT. La correlación entre patrón homogéneo y el reconocimiento del antígeno Scl-70 se observó también en los sueros de los pacientes con ES limitada ($r = 0.637$; $p < 0.01$). En los otros casos de ES no se observó correlación.

El patrón moteado grueso correlacionó con el reconocimiento de antígenos P-ribosomales para sueros de pacientes con ES limitada ($r = 0.466$; $p < 0.01$). El patrón correlacionó además con el reconocimiento de los antígenos Jo-1 ($r = 0.426$; $p < 0.01$), Ku ($r = 0.343$; $p < 0.05$) y M2 ($r = 0.326$; $p < 0.05$) en el caso de ES difusa.

En cuanto al patrón moteado fino, en pacientes con ES limitada/miopatía, observamos correlación con anticuerpos anti-SSA ($r = 1.0$; $p < 0.01$) detectado por ELISA. MF muestra también correlación con el reconocimiento de RNP/Sm detectado por ELISA ($r = 0.365$; $p < 0.05$) y Jo-1 detectado por EIT ($r = 0.303$; $p < 0.05$) para los casos de ES Limitada

El patrón citoplásmico granular correlacionó con los sueros positivos para Scl-70 detectado por ELISA ($r = 0.76$; $p < 0.01$), en pacientes con ES limitada. La reactividad contra Scl-70 determinada por EIT mostró una correlación de 0.325 ($p < 0.05$) en pacientes con ES difusa.

La correlación del patrón mitocondrial con el reconocimiento del antígeno M2 detectado por EIT fue de 0.329 ($p < 0.05$) y 0.328 ($p < 0.05$) para ES difusa y ES limitada, respectivamente.

El patrón anti-peroxisomas correlacionó, en el caso de ES difusa, con anticuerpos anti-DNAcs detectada mediante ELISA ($r = 0.483$; $p < 0.01$) y anti-SSB, detectado mediante EIT ($r = 0.352$; $p < 0.05$).

El patrón centromérico, mostró correlación significativa con anticuerpos anti-centrómero detectada mediante EIT en sueros de pacientes con ES difusa ($r = 0.787$; $p < 0.01$), ES limitada ($r = 0.812$; $p < 0.01$) y ESL/EMTC ($r = 0.789$; $p < 0.01$). Los anticuerpos CENP-B detectada por ELISA, mostró correlación en sueros de pacientes con ES limitada ($r = 0.768$; $p < 0.01$) y ES limitada/EMTC ($r = 0.717$; $p < 0.01$).

El patrón nucleolar correlacionó con la identificación de antígeno Pm/Scl, en el caso de ESL con miopatía ($r = 1.0$; $p < 0.01$).

- Una vez identificadas las correlaciones entre anticuerpos y patrones de IFI, se consideró útil determinar, además la correlación o asociación existente entre anticuerpos. Obteniéndose los siguientes resultados:
- El patrón homogéneo, correlacionado a títulos elevados con anticuerpos anti Scl-70 (ELISA $r=0.637$ en pacientes con ESL y 0.536 en pacientes con ESD y mediante EIT con pacientes ESD $r=0.314$), demostró además asociación con anticuerpos anti-nucleosomas tanto en sueros de pacientes con ESL ($r=0.447$) como en aquellos con ESD ($r=0.316$).
- En patrón moteado grueso en el que se observa asociación de anticuerpos anti proteínas P-ribosomales con ESL y anticuerpos contra Jo-1, Ku y AMA-M2 ESD, mostro en éste último caso asociación significativa ($r=0.4$) con SS-B (ELISA).
- El patrón moteado fino, en el que se halló asociación entre anticuerpos anti SS-A (ELISA) y ESL/Miopatía, mostró asociación del anticuerpo con anticuerpos anti centrómero ($r=1.0$) detectados mediante (EIT). Los anticuerpos anti RNP/Sm correlacionados con ESL, correlacionaron, a su vez, U_1 -RNP ($r=0.394$) y Sm ($r=0.385$). Observamos también asociación de RNP/Sm con anticuerpos anti nucleosoma, Scl-70 (ELISA) además de Jo-1 (ELISA y EIT).
- El patrón centromérico mostró correlación con anticuerpos anti centrómero mediante EIT (ESL $r=0.812$, $p < 0.01$), ESL/EMTC ($r=0.789$, $p < 0.01$), ESD (0.787 , $p < 0.01$) y anticuerpos anti-CENP-B mediante ELISA (ESL $r=0.768$, ESL/EMTC $r=0.717$). Los sueros de pacientes, con ESD, positivos para anticuerpos anti-centrómoro mediante EIT mostraron asociación con anticuerpos anti proteína P ribosomal, Ku y U_1 -nRNP, además de correlación con anti Cenp B determinado por ELISA. En el caso de pacientes con ESL se observó asociación tanto de anticuerpos anti centrómero determinado mediante EIT como por ELISA con anticuerpos anti proteína P ribosomal. La presencia de anti-centrómoro por EIT correlaciona con la determinación del anticuerpo mediante ELISA; además de asociación con anticuerpos anti-mitocondriales. El grupo positivo para anticuerpos anti centrómero mediante ELISA se asocia además con anticuerpos

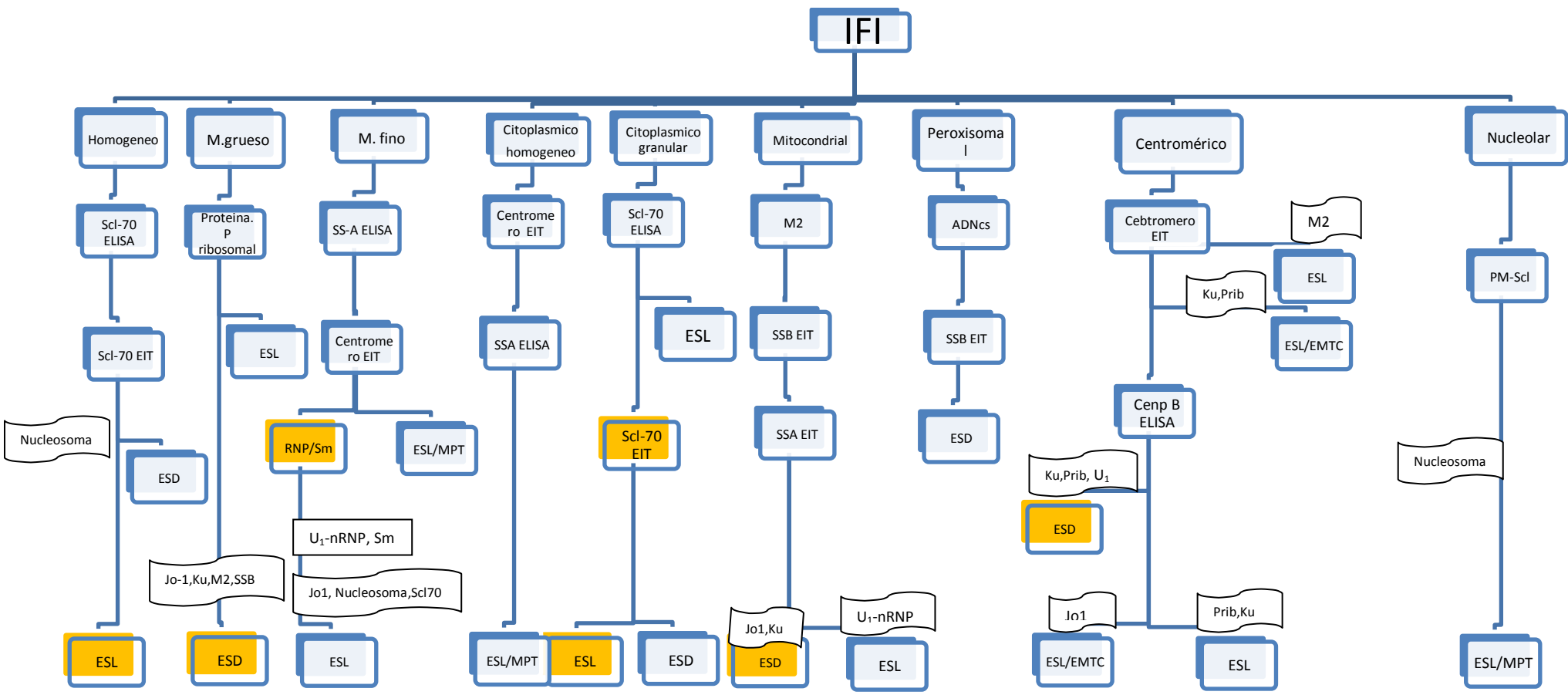
anti Ku. En el caso de ESL/EMTC, los sueros en el que se presentó correlación entre el patrón y el anticuerpo determinado por EIT se observó además asociación con proteína P ribosomal y Ku, además de correlación con el anticuerpo determinado mediante ELISA. El grupo en el que hubo correlación entre el patrón centromérico y la determinación del anticuerpo específico por ELISA; se observó además asociación con anticuerpos anti Jo-1 determinados por EIT.

- El patrón nucleolar correlacionó con anticuerpos anti PM-Scl ($r=1.0$); los que a su vez mostraron una fuerte asociación con anticuerpos anti-nucleosomas en pacientes con ESL/Miopatía.
- El patrón citoplásmico homogéneo, mostró fuerte asociación con el reconocimiento de proteínas del centrómero ($r=1.0$; detectada por EIT) y de SS-A ($r=1.0$; detectada por ELISA), en el caso de pacientes con ESL/Miopatía.
- Los sueros de pacientes con ESL que dieron un patrón citoplásmico granular, reconocieron Scl-70 ($r=0.7$ detectado por ELISA) y nucleosomas ($r=0.447$; detectados por ELISA). Los sueros de los pacientes con ESD que dieron el patrón citoplásmico granular también reconocieron el antígeno Scl-70 ($r=0.33$; detectado por ELISA, $r=0.314$ detectado por EIT). El patrón citoplásmico granular también se asoció con la reactividad anti-nucleosomas en los sueros de los pacientes con ESD ($r=0.313$).
- En la correlación entre el patrón mitocondrial y la reactividad contra el antígeno AMA-M2 mediante EIT tanto en ESL como en ESD. Mostró en el caso de ESL además asociación del anticuerpo con anticuerpos anti-SSB determinado por EIT ($r=0.574$) y determinado por ELISA ($r=0.323$), SS-A y U₁-nRNP ($r=0.307$). A diferencia de los sueros de los pacientes con ESD quienes mostraron asociación con el reconocimiento de Jo-1 ($r=0.488$), SSB ($r=0.437$) y Ku ($r=0.379$).
- El patrón descrito como anti-peroxisomas mostró asociación con el reconocimiento específico de DNAs y SS-B para sueros proveniente de ESD. A su vez los sueros que reaccionaron contra DNAs mostraron asociación con la anticuerpos contra histonas ($r=0.691$), nucleosomas ($r=0.325$), U₁-nRNP ($r=0.346$), Sm ($r=0.313$) y RNP/Sm ($r=0.301$). Los sueros que reaccionaron

contra SS-B, también reaccionaron contra RNP/Sm ($r=0.437$), Sm ($r=0.377$) y Scl-70 ($r=0.345$) mediante ELISA.

- A partir de las correlaciones y/o asociaciones entre patrones y autoanticuerpos, según los subtipos de esclerodermia, se elaboraron los siguientes algoritmos para los subtipos más frecuentes de la enfermedad en la población estudiada.

Algoritmo para Esclerodermia a partir de IFI sobre células HEp-2



Asociación
 Correlación
 Negativo

X DISCUSIÓN

El estudio demográfico en la población estudiada, muestra una relación mujer: hombre (9:1) que supero a lo reportado por la literatura³⁴ y mostró ser menor a lo descrito en población chilena³⁶; aunque llegó a coincidir con Bovone en un estudio en población argentina³⁵. Lo cual confirma la importancia del origen étnico en el desarrollo de la enfermedad y justifica el desarrollo del presente trabajo.

Respecto a la distribución de los subtipos de enfermedad, nuestro estudio muestra que las mujeres padecen mayormente (41%) el tipo limitado de la enfermedad; a diferencia de los hombres; en los cuales predomina la escleroderma difusa (75%). Esto además de reafirmar la mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes en mujeres; nos demuestra el desarrollo de formas más agresivas de la enfermedad en varones por lo que se sugiere ampliar el número de muestra del sexo masculino para estudiar sí el desarrollo de la patología está ligado a otros factores como ser medio ambientales, hormonales y laborales⁴.

La edad de inicio para las patologías de mayor frecuencia; oscilo entre 33 y 35 años de edad. A diferencia de la edad de inicio más tardía para CBP (44.2 años), ESL/Morfea (56.5 años), ESL/Vasculitis-colangiopatía (53 años); para cuyos casos requeriríamos ampliar la muestra para determinar si dicho hallazgo se debe al desarrollo tardío de estas formas de la enfermedad o son patologías propias de personas adultas. Los estudios comparativos sólo han sido desarrollados de una manera general; sin especificar los subtipos de la enfermedad; al menos en lo referente a la distribución según edad^{34, 36}.

Las frecuencias observadas, en toda la población, de los subtipos de escleroderma, muestran que 37% de los casos presentó ESD, 63% ESL. Dentro éste grupo, la ESL sola (60%) y la ESL/EMTC (24.7%) fueron las de mayor frecuencia. Nuestro estudio confirma lo reportado en población americana³⁴ y otros, al menos en los principales subtipos. Lo cual da muestra que la distribución de los subtipos de enfermedad en la población mexicana es similar al de las poblaciones reportadas.

La expresión de los diferentes patrones mediante IFI fue muy diversa. El subtipo ESL presentó una mayor frecuencia de patrón centromérico (41%) y patrón moteado grueso (32%), en el grupo de ESD el patrón más observado fue el homogéneo (36.2%). En

cuanto a los síndromes de sobre posición: la población con ESL/EMTC presentó las mayores frecuencias de patrones MF (47%) y citoplásmico (47%), ESL/MPT presentó en mayor porcentaje el patrón nucleolar (33%) y ESL/CBP (60%). Un trabajo realizado por Hesselstrand ²⁹ *et al*, con 276 pacientes suizos (74% mujeres) con diagnóstico de escleroderma de los cuales 25% tenían ESD y 75 % ESL, mostró que el 84% de los pacientes tuvieron AAN positivos con patrones de IFI: moteado en el 41% de los casos, homogéneo en el 25%, nucleolar en el 24%, centromérico en el 18% y contra el aparato mitótico en el 0.7%.

La diferencia en la expresión de patrones nos muestra cierta especificidad o correspondencia patrón-subtipo de escleroderma. Esto último confirma lo reportado en la literatura, en algunos de los casos, como el del patrón centromérico que se considera como típico de ESL y el mitocondrial propio de CBP ^{6, 17, 20, 23, 31, 34, 37}.

El patrón centromérico se asocia clínicamente con el síndrome de CREST en algunos reportes (60%) ¹⁷ y con menor fuerza en otros (4%) ²⁹. El diagnóstico de los pacientes del presente estudio no incluyó un grupo que considere específicamente el síndrome de CREST. Nuestros resultados muestran que los anticuerpos anti-centrómicos se detectaron en el 41-43% de los casos con ESL y el 19 al 28% de los pacientes con ESD, lo que demuestra que estos anticuerpos no son exclusivos del síndrome de CREST ³⁸, por lo que consideramos importante aumentar el número de pacientes con síndrome de CREST.

Caramaschi³⁰ y colaboradores realizaron un estudio en 44 pacientes italianos, en el cual se observó una frecuencia mayor de AAC en pacientes con ESL (60%) con afectación visceral y fenómeno de Raynaud. Allcock³¹ y colaboradores reportaron en el Reino Unido la asociación de ESL con la presencia de AAC y de ESD con la presencia de anticuerpos anti-Scl-70.

Vlachoyiannopoulos⁶ y colaboradores observaron una alta frecuencia de AAC en ESL (64%) en población griega. Un metanálisis realizado por Kikuchi²⁰ y colaboradores mostró prevalencias de AAC de 8.8-54.5% y de anticuerpos anti-Scl-70 de 11.8-87.5% y una prevalencia simultánea entre el 0.7% y 5.6%. Jacobsen S.²⁸ observó que el 90% de los pacientes con escleroderma, tuvieron AAC y anti-Scl-70, correlacionando con ESL y ESD respectivamente.

En cuanto a los patrones Th/To no se observó la prevalencia reportada²⁷ para ESL, los resultados mostraron frecuencias mayores para CBP y Miopatía; pero debido al tamaño de la muestra no se consideran concluyentes.

El patrón citoplásmico granular correlacionó con positividad anti-Scl-70 detectado mediante ELISA en los sueros de pacientes con ESL, y con ESD detectados mediante EIT. Es el primer reporte de ésta asociación en pacientes con ES; pues no se cuenta con literatura que reporte asociaciones con dicho patrón; por lo que se recomienda, además de ampliar la muestra proceder a una caracterización de dicho patrón.

Los pacientes con escleroderma difusa tuvieron una alta frecuencia de anticuerpos anti-Scl-70 (47% detectado por ELISA y 38% detectado por EIT); frecuencia que resulta diferente a lo reportado por Hesselstrand²⁹ y Haustein⁴⁸, ambos en poblaciones caucásicas; pero similar a lo reportado por Kikuchi en población japonesa¹¹.

ESL presentó una alta frecuencia de anticuerpos anti centrómero-B positivos: 41% (detectado por ELISA) y 43% (detectados por EIT), frecuencias menores a los reportado en otras poblaciones^{6, 20, 18, 39}. Brnaett⁷ y colaboradores, en Australia, observaron que existe una correlación de sobrevida de 11.7 años en pacientes con AAC positivos y de 1.1 en pacientes AAC negativos, por lo que consideró que los AAC son un marcador de pronóstico favorable.

Los anticuerpos anti-SSA estuvieron presentes en 54.5% (EIT) de los pacientes con ESL; este anticuerpo no se había reportado en ESL^{3, 20, 33}, es de hecho un marcador de síndrome de Sjögren.

Los anticuerpos de mayor prevalencia en el subtipo de síndrome de sobreposición ESL/EMTC fueron: los anti-RNP con 88 % de frecuencia; anti-Sm con 36% de frecuencia; anti-DNAcd con 82.4% de frecuencia; DNACs 29.4% y 59% nucleosomas detectados todos mediante ELISA. La detección por EIT, mostró que los anticuerpos anti-U₁nRNP se presentó en 47% de los casos y anticuerpos anti-P ribosomales en 59% de éstos. Los anticuerpos reportados en la literatura son DNACs (20-50%), característicamente anticuerpos anti-RNP, siendo la molécula mayormente reconocida U₁nRNP (95-100%). El resto de los anticuerpos se reportan como característicos de LEG y SS^{17, 18, 33}.

De los casos de ESL/CBP sólo el 20% mostró la presencia de anticuerpos anti-M2. Todos estos pacientes tuvieron anticuerpos anti-DNAcd, anti-SSA, anti-centrómero, anti-P ribosomales, anti-Ku. La literatura reporta la presencia de anticuerpos anti-M2 como específicos para CBP; por lo que podríamos pensar que la presencia de los otros anticuerpos podría deberse a la sobreposición con ESL. Lo anterior sugiere la necesidad de realizar el estudio en población más numerosa con ESL/CBP y otra que padezca únicamente de CBP, para poder determinar la razón de la diferente presentación de autoanticuerpos.

Nuestros casos de sobreposición ESL/MPT mostraron frecuencias similares a lo reportado en la literatura, en relación a anticuerpos anti-Pm/Scl y Jo-1^{3, 25}, además de una elevada prevalencia de anticuerpos anti-nucleosomas, SS-A y proteínas P ribosomales, lo cual no había sido reportado previamente.

La comparación entre resultados del análisis de presencia de autoanticuerpos, mediante ELISA y EIT; nos permite observar discrepancias en cuanto a la prevalencia de dichos anticuerpos en los subtipos de escleroderma. En el 80% de los casos, los valores de un anticuerpos determinado por ELISA resulto ser mayor por EIT; pero en los menos fueron de valor menor y en un 4% resultaron iguales; específicamente en algunos anticuerpos presentes en CBP.

También observamos autoanticuerpos, que no detectamos por ELISA y que fueron positivos mediante EIT. En ninguno de los casos se pudo observar una positividad dada por ELISA que no haya sido detectada por EIT; lo cual nos lleva a concluir lo siguiente:

- La EIT es un método más sensible para la detección de autoanticuerpos.
- Los epítopes de los antígenos corridos en la EIT son diferentes a los presentes en ELISA.

Ambos planteamientos, según la literatura son posibles^{8, 15, 17}, por lo cual no podemos quedarnos con un solo método de detección de autoanticuerpos para apoyar al diagnóstico de un subtipo y/o descartar otro. Esto nos habla de la posibilidad de caer en falsos negativos si se recurre a uno sólo de los métodos; lo cual es malo para el

paciente, quien no contara con un diagnóstico certero por el laboratorio repercutiendo en su tratamiento y calidad de vida.

El recurrir al análisis de todos los casos, mediante los dos métodos, aparte de IFI, no sólo resulta costoso; sino que además dificulta la interpretación de resultados.

La elaboración y seguimiento de algoritmos desarrollados a partir del análisis de una población previamente diagnosticada, permite reducir la cantidad de exámenes y por ende su costo así como el tiempo de entrega de resultados; lo cual repercute de manera favorable en la salud del paciente y el empleo de recursos.

El análisis de la correlación entre patrones de inmunofluorescencia y la caracterización de las especificidades de los anticuerpos permitió identificar anticuerpos que correlacionan o se asocian con los patrones de inmunofluorescencia indirecta, de manera directa o indirecta, según el subtipo de enfermedad.

El patrón homogéneo (PH), en nuestro estudio correlaciona con anticuerpos anti-Scl-70, detectados por ELISA para pacientes con ESD y ESL; en éste punto la diferenciación entre ESL y ESD podría realizarse gracias a la asociación que presentan los pacientes con ESD a anticuerpos anti-Scl70 determinado por EIT que no se observa para ESL. Lo reportado con respecto al PH lo muestra como propio de anticuerpos anti-DNAcd y otros antígenos asociados a la cromatina a títulos altos. En nuestro trabajo, los títulos fluctuaron entre 1:1280 y 1:5120 correlacionando únicamente con anticuerpos anti-Scl-70 y no así con anticuerpos anti DNAcd.

Respecto al patrón moteado grueso (MG), observamos correlación con anticuerpos anti-P-ribosomales en pacientes con ESL y con anticuerpos anti-Ku, M2 y Jo-1 para ESD. Los reportes en la literatura muestran que los anticuerpos anti-P-ribosomales se asocian con la presencia de anticuerpos que reconocen la matriz nuclear: Sm, U₁RNP, hnRNP de 60 y 70 kDa.

El patrón moteado fino (MF) correlacionó con anticuerpos anti-SSA (ELISA), anti centrómero (EIT) en pacientes con ESL/MPT y RNP/Sm (ELISA) y Jo-1(EIT) en pacientes con ESL. Los reportes en la literatura muestran que los pacientes con ESL tienen en circulación anticuerpos anti-SSA/Ro, SS-B/La y RNA polimerasas II y III principalmente.

Resulta importante tener en cuenta que la definición, en la literatura, de los patrones MG y MF no está del todo clara, lo que genera cierta confusión; por lo que se sugiere realizar una caracterización de éstos dos patrones. En el laboratorio de Inmunología del Departamento de Inmunología y Reumatología se está trabajando en ello ⁴⁰.

En cuanto al patrón mitocondrial éste correlacionó, como era de esperarse, con la presencia de anticuerpos que reconocen el antígeno M2 mitocondrial, tanto en sueros de pacientes con ESL como en los de ESD. Observamos, además, asociaciones indirectas en pacientes con ESL con anti-SSA, anti-SSB, anti-U₁RNP y en el caso de ESD con anti-Jo-1, anti-SSB y anti-Ku.

En ES, los anticuerpos anti-mitocondriales se reportan con una prevalencia de 1.1% y se asocian principalmente con dermatomiositis (95%) ³¹, cirrosis biliar primaria y una frecuencia de 40% en casos de escleroderma, lo cual difiere con nuestro trabajo en el que las prevalencias observadas fueron: 10.5% en ESD, 13.6% en ESL y 60% en ESL/CBP. Cabe resaltar que la determinación de los anticuerpos anti-mitocondriales M2 se realizaron mediante EIT.

El patrón anti-peroxisomas se asoció con actividad anti-DNAcs y anti-SSB en pacientes con ESD, los reportes hablan de una asociación clínica poco clara debido a un patrón similar producido por reconocimiento de microsomas de retículo endoplásmico.

El patrón centromérico correlacionó con la detección de los antígenos específicos del centrómero, tanto por EIT como por ELISA. La correlación de anticuerpos anti-centrómero se observó para ESD, ESL y ESL/EMTC en los exámenes empleando EIT. A diferencia de la correlación del anticuerpo con ESL y ESL/EMTC determinado mediante ELISA la presencia de anticuerpos contra proteínas P-ribosomales y anti Ku se asoció con la presencia de anticuerpos anti-centrómeros, permitiendo la diferenciación de ESL de ESL/EMTC. Los pacientes con ESD presentaron igualmente asociación a anticuerpos anti proteína P ribosomal y Ku; además de una asociación a anti-U₁nRNP, lo cual permitiría su diferenciación de ESL y en caso de contarse únicamente con el método de EIT para la determinación de anticuerpos anticentrómero. El patrón nucleolar correlacionó con anticuerpos anti- PM-Scl en el caso de ESL/MPT, mostrando además asociación con anticuerpos anti-nucleosomas. De acuerdo a lo reportado en la literatura, el patrón nucleolar se presenta en síndromes de sobre

posición polimiositis/escleroderma (PM/Scl) y con menor frecuencia en las enfermedades primarias. El reconocimiento de la proteína PM1 α se ha reportado exclusivamente en pacientes con escleroderma o polimiositis y con mayor incidencia en los síndromes de sobreposición polimiositis/escleroderma²⁵. Si bien la correlación encontrada, es significativa, pensamos que es importante ampliar la muestra y detectar la reactividad anti-PM1 α en pacientes con miopatía sin otra enfermedad autoinmune para evaluar la especificidad del anticuerpo.

XI. CONCLUSIONES

- La población mestiza mexicana mostró que el sexo femenino tiene aproximadamente 10 veces mayor propensión al desarrollo de escleroderma siendo más frecuente la forma limitada de la enfermedad. En cuanto al sexo masculino, su prevalencia es menor (10%) con predominio de la forma difusa.
- Los tipos más frecuente de escleroderma son la forma limitada (60.8%) y la forma difusa (39%).
- Los tipos comunes de enfermedad se desarrollan a edades relativamente tempranas (35 años).
- Dentro el grupo de ESL: 60% presenta ESL y 24.7% ESL/EMTC, 7% ESL/CBP y 4% ESL/Miopatía.
- El empleo de IFI con células HEp-2, como herramienta de tamizaje, resulta de mucha utilidad; pues permite encaminar al clínico a la correcta aplicación de pruebas de especificidad de anticuerpos.
- Los pacientes con diagnóstico de escleroderma, presentan distintas frecuencias de autoanticuerpos según el subtipo de enfermedad desarrollada; por lo que existen correlaciones y asociaciones diferentes entre patrones y autoanticuerpos.
- La correlación presente entre autoanticuerpos y expresión de distintos patrones en IFI, puede deberse a causalidad o puede tratarse de asociaciones, razón por la cual se recomienda esta técnica como de escrutinio para la identificación de autoanticuerpos y apoyo a la clasificación de los distintos subtipos de escleroderma.

- La exposición de diferentes epítopes de un mismo antígeno, según el método de elección (ELISA o EIT) debe llevar al clínico a confirmar la especificidad de los autoanticuerpos presentes, empleando el algoritmo sugerido como base para inferir su presencia.

- El empleo de los algoritmos deben realizarse con cautela, ya que constituyen guías para la caracterización de la reactividad de las muestras de pacientes con ES que requieren un fortalecimiento a través de la ampliación del número de casos.

XII. Anexos

Patrones de Inmunofluorescencia usando como sustrato células HEp-2

La observación de marcaje fluorescente específico descrito a continuación indica un resultado positivo a la dilución recomendada. Existen diferentes patrones de fluorescencia nuclear que pueden coexistir en un mismo suero e incluso modificarse con la dilución del mismo. Los principales patrones de anti-nucleares observados en el presente trabajo son:

1. Homogéneo: Fluorescencia uniforme, difusa de todo el núcleo de células en interfase, presentando mayor intensidad en la región cromosómica de células en mitosis. Tinción del citoplasma negativa.
2. Moteado grueso: Gránulos grandes en la red nuclear esponjosa. La tinción de los nucleolos es positiva y la tinción de la cromatina es negativa.
3. Moteado fino: Granulos finos o gruesos en el nucleoplasma de células en interfase. En células en división no se tiñe la cromatina. La tinción de los nucleolos es negativa.
4. PCNA (del inglés proliferating cell nuclear antigen): Es la tinción que varía de moteado fino a moteado grueso en aproximadamente el 60% de células en la fase S temprana, la tinción en las células en división es negativa. En las células en fase S tardía se observa tinción en la membrana nuclear, esta no es frecuentemente fuerte y se puede perder por un patrón moteado u homogéneo. La síntesis es baja en células quiescentes y aumenta antes de la síntesis de DNA, dando una fuerte tinción en la fase S.
5. Centromérico o moteado discreto: Se observan entre 40 a 60 puntos distribuidos en el núcleo de células en interfase. Los puntos se alinean con los cromosomas en las células en división.
6. Nucleolar: Tinción de los nucléolos por el reconocimiento de anticuerpos anti-PM-Scl. Las células en metafase muestran una tinción difusa débil de la cromatina.
- 7 Centriolar: Tinción de los centriolos en células en división

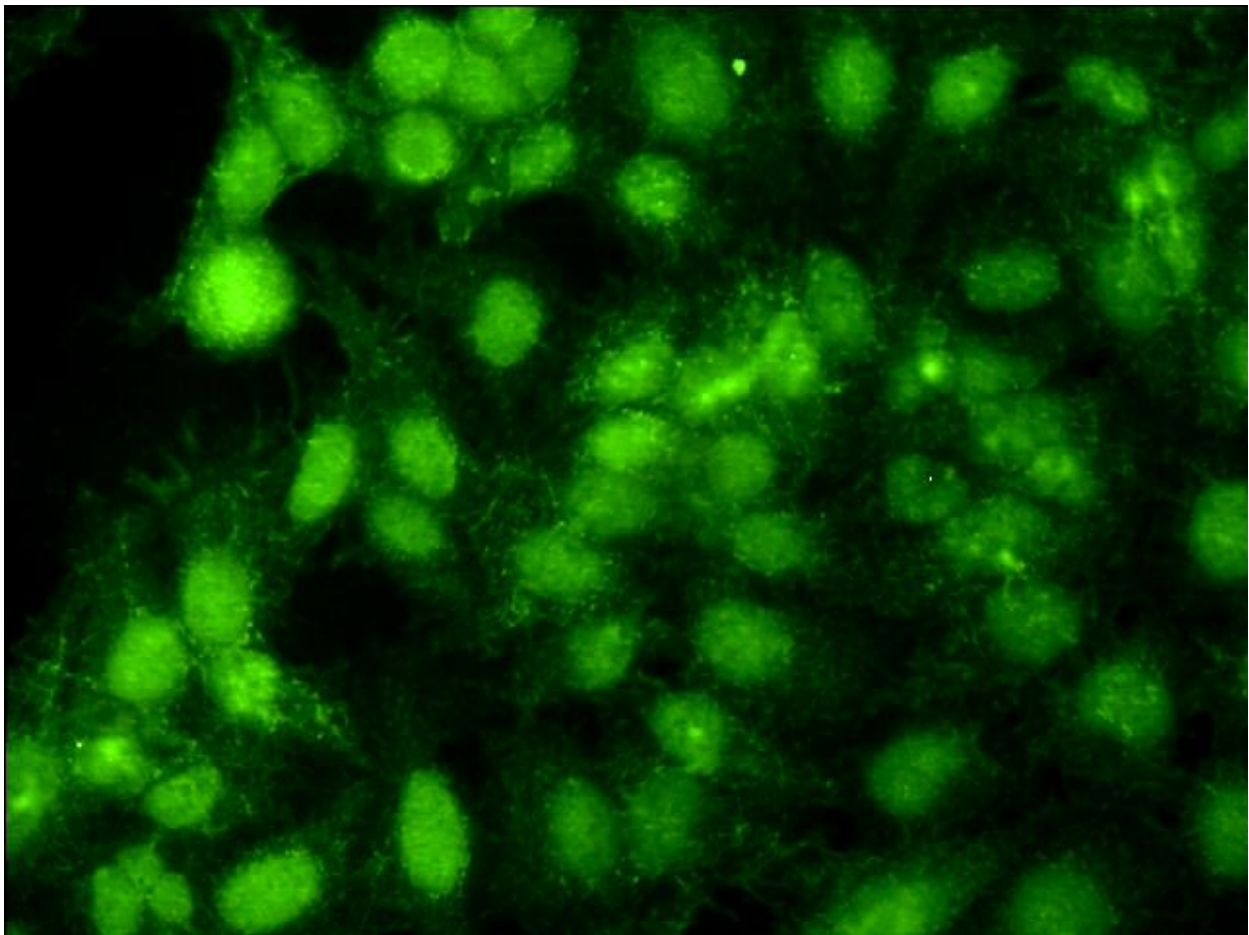
8. Aparato nuclear mitótico (NuMA o MSA-1): Tinción de los nucleolos y filamentos del huso acromático en células en división, sin tinción de la cromatina en células en división. Tinción moteada nuclear con nucléolos negativos en las células en interfase.

9. Jo-1: Tinción en la que se observan gránulos finos alrededor del núcleo y en menor cantidad en la periferia del citoplasma, típica de Jo-1 y otras anti-tRNA sintetasa.

10. Mitocondrial: numerosos filamentos granulares gruesos citoplasmáticos extendidos alrededor del núcleo que se extienden a través del citoplasma.

11. Peroxisomas: Punteado fino de tamaño uniforme distribuido al azar alrededor del núcleo. No presenta tinción nuclear o de la cromatina.

Patrón Citoplásmico Granular en células HEp-2



XIII Bibliografía.

1. Mathieu C. Tamby, Youri Chanseaud, Loïc Guillevin, Luc Mouthon. New insights into pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 2003; 2(3):152-157.
2. Rnaett FC; HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis); *Int.Rev. Immunology*; 1995; 12 (2-4): 107-28.
3. Smith M. Escleroderma. *Tratado de enfermedades autoinmunitarias*. 1ª ed. McGraw-Hill Interamericana; 2002, págs. 595-606.
4. Connie R.M., Diene T., *Autoimmune diseases*; Prentice Hall, 2006.
5. Gilliland B. *Esclerosis Sistémica*; *Medicina Interna de Harrison*; Ed. McGraw-Hill; 14 edición; 1998.
6. Vlachoyiannopoulos P. G., Drosos A. A., Wiik A., Moutsopoulos H. M. Patients With Anticentromere Antibodies, Clinical Features, Diagnoses And Evolution; *British Society For Rheumatology*: 1993; 32:297–301.
7. Brnaett A.J., Miller MH, Littlejohn G.O. A survival study of patients with scleroderma diagnosed over 30 years (1953–1983): The value of a simple cutaneous classification in the early stages of the disease. *J Rheumatol* 1988; 15:276–83.
8. Arthur Kavanaugh, MD; Russell Tomar, MD; John Reveille, MD; Daniel H. Solomon, MD, MPH; Henry A. Homburger, MD *Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens*; *Arch Pathol Lab Med*; 2000 Vol. 124, No. 1, pp. 71–81.
9. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28(7):1573-6.
10. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-90.
11. Nadashkevich O, Davis P, Fritzler MJ. A proposal of criteria for the classification of systemic sclerosis. *Med. Sci. Monit.* 2004 ;10(11)

12. Varga J., Bashey R.I. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12(2-4):187-99.
13. Shoenfeld Y; Gershwin M. E.; Meroni P.L.; 2007; *Autoantibodies*; Elsevier; 2 edición.
14. Inmunofluor-ANAHEp-2
www.Biocientifica.com.ar/español/instructivos/inmuno_ANA, actualizado al 01/01/2001.
15. Bradwell A. R. , Hughes R.G., Harden E.L.; *HEp-2 patterns and laboratory techniques*; Third Edition; Birmingham, UK.; 2007.
16. Fernández M.S.; Autoanticuerpos más frecuentes en enfermedades del tejido conectivo. *Revista de la Sociedad de Medicina Interna de B. Aires*; 02 del 2004.
17. Reveille J.D., Solomon D.H. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Care & Research* 2003;49:399-412.
18. Reeves Wh. Use of monoclonal antibodies for the characterization of novel DNA-binding proteins recognized by human autoimmune sera. *J Exp Med* 1985; 68: 611-20.
19. Kikuchi M., Inagaki T. Bibliographical study of the concurrent existence of anticentromere and topoisomerase I antibodies. *Clin Rheumatology* 2000; 10(6): 435-41.
20. Lodish, Berk, Zipurski, Matsudaira, Baltimore, DRNAell; *Biología Celular y Molecular*; Ed. Médica Panamericana; 4^o edición; 2002.
21. Wang J., Satoh M., Kabir F., Shaw M., Domingo M. , Mansoor R. , Behney K. , Xingwen D. , Lahita R. , Richards H., Reeves W. Increased prevalence of autoantibodies to Ku antigen in African American versus white patients with systemic lupus erythematosus; *Arthritis Care & Research*; Volume 44 Issue 10, Pages 2367 – 2360.

22. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TA; Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies; *Jr. Arthritis Rheum* 1994; 37: 902–6.
23. Jiménez L.F, Merchant H.; *Biología celular y molecular*; Ed. Pearson Hall, México; 2003
24. Mahler M., Raijmakers R., Dälurich C., Blúthner, Fritzler M. Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?artid=1174964>
25. Reimer G., Scheer U., Peters J.M., Tan E.M.: Immunolocalization and partial characterization of a nucleolar autoantigen (PM-Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. *J Immunol* 1986, 137:3802-3808.
26. Yamane K., Ihn H., Kubo M., Kuwana M., Asano Y., Yazawa N., Tamaki K. Antibodies to Th/To ribonucleoprotein in patients with localized scleroderma. *Rheumatology* 2001; 40: 683-686.
27. Jacobsen S., Halberg P., Ullman S., Van Venrooij W. J., Héier-Madsen M., Wiik A., Petersen J. Clinical Features And Serum Antinuclear Antibodies In 230 Danish Patients With Systemic Sclerosis. *British Journal Of Rheumatology* 1998; 37:39±45.
28. Hesselstrand R., Scheja A., Shen1 G. Q., Wiik2 A., Åkesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2003; 42: 534-540.
29. Caramaschi P., Biasi D., Manzo T, Carletto A., Poli F, Bambara LM. Anticentromere antibody-clinical associations. A study of 44 patients. *Rheumatol Int.* 1995; 14:253-5.
30. Allcock R. J., Forrest I., Corris P. A., Crook1 P. R., Griffiths2 I. D. A study of the prevalence of systemic sclerosis in northeast England. *Am J Epidemiol* 1992; 135(9):1060–7.
31. Rosas I., Gomez E.I, Núñez-Álvarez C.A, Huerta M.T, Alvarado A., Cabiedes J.; Referencia de puntos de corte. Prevalencia de anticuerpos anti-nucleares (ANN) en

donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. [Rev Mex Reumatol](#) 2005; 20(1):159.

32. Alvarado Hernández A. Determinación de anticuerpos anti. DNACd por tres métodos: Validación del ELISA caiotrópico. Instituto Nacional de Nutrición Salvador Subirán – UNAM; 2006.
33. Schachna L., Wigley F., Gelber A.; Age and Risk Pulmonary Arterial Hypertension in Scleroderma; Dic 2003;Chest 124(6):2098-2104.
34. Bovone N.S., Fuente M.C., Eposto M.O., Londero P.; Detección de anticuerpos anti-núcleo con inmunoensayo lineal: Correlación con inmunofluorescencia indirecta; Acta Bioquím. Clín. Latinoam. v.39 n.4; 2005.
35. Soto S. Escleroderma;
https://www.u-cursos.cl/medicina/2008/0/MMEDIC24/1/material_alumnos/objeto/22164
36. Denton C.P., Black C.M. Scleroderma: clinical and pathological advances. Best Pract Res Clin 2004; 18(3):271-290.7729.
37. Zuber M., Gotzen R., Filler I. Clinical correlation of anticentromere antibodies. Clin Rheumatol. 1994;13(3):427-32.
38. Hausteil U.F. Dermatology on line Journal; vol (1): 3; 1995;190(1):83-4.
39. Pagliola A. Caracterización inmunoquímica de los patrones de inmunofluorescencia (IFI) moteado grueso y moteado fino en pacientes con enfermedades autoinmunes. Tesis de especialidad en Bioquímica Clínica. Facultad de Química, 2009.