



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA POR
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) Y
ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (EIT) DE LOS PATRONES MOTEADO
GRUESO Y MOTEADO FINO EN PACIENTES CON ENFERMEDADES
AUTOINMUNES.

TESINA QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

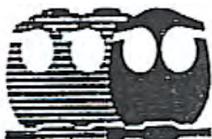
P R E S E N T A:

Q. LETICIA PAGOLA SANATANDER

ASESOR: Dr. JAVIER CABIEDES CONTRERAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

MÉXICO, D.F.

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.

AGRADECIMIENTOS

Muchas manos, muchos corazones y muchas mentes suelen contribuir a los logros notables de alguien...

Así que a todos esos corazones que hicieron de esta tesis un gran proyecto no solo de investigación, sí no también de vida y en donde quiera que se encuentren gracias.

Dr. Caviédes, cada una de sus enseñanzas que me brindó me ayudaron y ayudarán no solo en el mundo de la investigación, sí no también en el arte de vivir.

Tere, Ara, Martha, Carlos, José Luis todo su apoyo y conocimientos se resume en esta tesina.

DEDICATORIA

A mis papas por cada uno de sus consejos, pero sobre todo por ser mis grandes cómplices en cada cosa que hago, papas tener su sangre es mi honra pero sobre todo sé que donde quiera que vaya tengo sus bendiciones que me protegen el corazón.

Liz no solo eres mi hermana, eres mi compañera de aventuras y mi gran inspiración, toda mi admiración y respeto al gran ser humano que eres.

A mi libro de cuentos (Dany) el cual nunca dejo de leer y hace que la vida tenga otro sentido.

Carlos por ser el gran apoyo no solo de tu pequeña familia si no de la mía.

A mi dos mosqueteros, lindo es que estén conmigo y donde quiera que nos lleve la vida gozaremos de la bendición del cielo.

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	2
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Anticuerpos Anti-nucleares (AAN)	6
2.1.1 Asociación de Anticuerpos Anti-nucleares con Enfermedades Autoinmunes	7
2.1.2 Detección de Anticuerpos Antinucleares	9
2.1.3 Patrones de Inmunofluorescencia Indirecta observados en células HEP-2	11
2.1.3.1 Características de los patrones de tinción detectados mediante IFI	12
2.1.3.2 Patrones moteado fino y moteado grueso	13
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Pacientes y Criterios de Inclusión	22
5.2 Estrategia de estudio	22
5.3 Muestras	22
5.4 Reactivos y Materiales	23
5.4.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	23
5.4.2 Electroinmunotransferencia (EIT)	23
5.5 Fundamento	23
5.5.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	24
5.5.2 Electroinmunotransferencia (EIT)	25
6. RESULTADOS	27
6.1 Características demográficas	27
6.2 Caracterización inmunoquímica de la reactividad de las muestras que dieron patrones moteado fino y moteado grueso contra componentes nucleares mediante electroinmunotransferencia (EIT).	34
6.2.1 Patrón moteado grueso	34
6.2.2 Patrón moteado fino	35
7. DISCUSIÓN	41
8. CONCLUSIONES	49
9. BIBLIOGRAFÍA	51

ABREVIATURAS

AAN	Anticuerpos anti-nucleares
AR	Artritis reumatoide
BCIP	Sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato
DNAcd	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
EIT	Electroinmunotransferencia
EMTC	Enfermedad mixta del tejido conectivo
ENA	Antígenos extraíbles del núcleo
ES	Esclerosis generalizada
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
LEG	Lupus eritematoso generalizado
RNA	Ácido ribonucleico
MF	Patrón de IFI moteado fino
MG	Patrón de IFI moteado grueso
NBT	Cloruro de nitro-azul de tetrazolio
SSj	Síndrome de Sjögren
T1	Título 1:640
T2	Título 1:1280
T3	Título 1:2560
T4	Título 1:5120

1. RESUMEN

Por la información que proporciona la detección de anticuerpos anti-nucleares (AAN) mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) se ha sugerido como la primera prueba de laboratorio que apoya el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. Los patrones moteados fino y grueso generan confusión, por lo que se ha sugerido que se defina al patrón moteado fino como aquel en el que el núcleo se tiñe con gránulos finos o gruesos, la tinción en los nucleolos y en la cromatina es negativa, en tanto que en el patrón moteado grueso se tiñe el núcleo con gránulos finos o gruesos, la tinción de los nucleolos es positiva y no se tiñe la cromatina.

Objetivo. Identificar los antígenos que reconocen los anticuerpos que dan los patrones moteado fino y grueso, e identificar si existe correlación de dichos patrones con diferentes enfermedades autoinmunes.

Materiales y métodos. Se recabaron 64 muestras de pacientes (62 mujeres) con edad promedio de 44.7 años \pm 15.9. De los sueros estudiados y que presentaron el patrón moteado fino o grueso, 71% de eran de pacientes con enfermedades autoinmunes, en tanto que, el 29% restantes pertenecían a otras patologías. Se detectaron anticuerpos anti-nucleares mediante IFI con células HEp-2 como sustrato y anticuerpos anti-IgG humana marcado con FITC. Mediante electroinmunotransferencia (EIT) se identificaron los antígenos específicos de cada patrón.

Resultados. Se obtuvo que 42 casos (65.6%) presentaron patrón moteado fino (MF) y 22 (34.4%) moteado grueso (MG) con títulos mayores a 1:640. En el análisis de las muestras por la técnica de EIT, se mostró que aquellas que dieron el patrón MG reconocieron el antígeno Ro-52 recombinante en un 36%, seguido del antígeno CENP-B recombinante (32%), 14% reconocieron los antígenos P-ribosomales (P1 y P2) y 14% el antígeno SS-A nativo de 60 kDa. Las muestras que dieron patrón MF reconocieron los siguientes antígenos: 55% SS-A de 60 kDa nativo, 55% Ro-52 recombinante; 14% reconocieron el antígeno Ku de 72 kDa, 12% SS-A de 52 kDa. 10 % de las muestras reconocieron CENP-B recombinante, AMA-M2, RNP de 70 kDa y RNP A de 32 kDa.

Discusión. En base a los resultados, confirmamos que existen diferencias entre los patrones moteado grueso y fino no solo en función del tamaño de los gránulos en el nucleoplásma, sino también en función del reconocimiento de componentes del núcleo. Ya que en el patrón MG se reconocieron dos moléculas características del patrón siendo estas el antígeno SSA (Ro) de 52 kDa recombinante y la molécula PM-Scl (PM-1). Sin embargo, al emplear antígenos recombinantes con la finalidad de aumentar la sensibilidad del ensayo, se pueden tener reacciones cruzadas que sugieren el reconocimiento de otros antígenos. En la caracterización de los sueros que dieron patrón MF se confirma la presencia de anticuerpos contra el complejo SSA (Ro) de 60kDa en este patrón, los cuales se han reportado como característicos en el patrón moteado fino.

Dentro de la relación que encontramos entre estos patrones y las enfermedades autoinmunes, observamos que la mayor relación se encontró en pacientes con diagnóstico de LEG.

Conclusiones. Debido a que la detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia es la prueba de tamizado inicial que ayuda en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes, es importante definir de manera específica las características de los patrones observados.

De acuerdo a los resultados obtenidos demostramos que los patrones moteado fino y patrón moteado grueso tienen diferentes características inmunoquímicas, así como también la relación de estos con las diferentes enfermedades autoinmunes, sobre todo en pacientes como LEG.

2. INTRODUCCIÓN

A principios del siglo XX, Paul Ehrlich postuló la teoría conocida como “horror autotoxicus”, en donde explicaba la posibilidad de que el sistema inmunológico de un individuo reaccioné contra los tejidos del mismo y acuñó el término de autoinmunidad. Hoy en día se sabe que los elementos claves para el desarrollo de la autoinmunidad son el reconocimiento de los antígenos propios por linfocitos autoreactivos, la activación de estos y la lesión causada por las células efectoras y sus productos.

Una de las características más importantes de los procesos autoinmunes es la presencia de autoanticuerpos, es decir, inmunoglobulinas con especificidad contra componentes antigénicos de células y tejidos propios. Algunos de estos anticuerpos participan directamente en los procesos de generación de las reacciones que causan el daño tisular, pero en algunos casos el papel que representan es incierto y en otros su significado es desconocido. Sin embargo, la detección de estos autoanticuerpos en el suero de los pacientes es de utilidad como marcadores de procesos autoinmunes [1].

2.1 Anticuerpos anti-nucleares (AAN)

Los AAN son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos con reactividad predominante contra antígenos nucleares (DNAcd, RNA, etc), pero también contra otros antígenos localizados en el citoplasma.

La detección de los AAN es útil como ayuda para el diagnóstico, pronóstico, seguimiento y tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunes.

Se ha observado que existe correlación entre los AAN positivos con la actividad de lupus eritematoso generalizado (LEG) y negativos con la inactividad o remisión de la enfermedad [2]. En algunos pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren (SSj) o dermatopolimiositis los AAN detectados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) pueden ser negativos. Por otro lado, se han reportado que los pacientes que tienen fenómeno de Raynaud y presentan anticuerpos anti-centrómero o anti-DNA topoisomerasa-I con el tiempo pueden llegar a desarrollar escleroderma [3].

2.1.1 Asociación de Anticuerpos Anti-nucleares con Enfermedades Autoinmunes

Si bien no existen anticuerpos específicos de una enfermedad, algunos pueden estar presentes con mayor frecuencia en una enfermedad autoinmune determinada *vg.* Los anticuerpos anti-DNAcd se consideran marcadores de actividad en pacientes con LEG. Mientras que los antígenos anti-Sm y anti-P-ribosomales también son considerados marcadores específicos de LEG, pero no de la actividad de la enfermedad aunque la ausencia de anti-Sm no excluye el diagnóstico de LEG [4].

Algunos pacientes presentan signos y síntomas clínicos compatibles con más de una enfermedad autoinmune generalizada, tal es el caso de los pacientes con enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) que presentan también síntomas de LEG, esclerodermia, miositis y cuyas determinaciones de AAN muestran niveles altos de anticuerpos anti-RNP. En base a lo anterior, se considera que los anticuerpos anti-RNP son un buen marcador serológico para pacientes con EMTC [5].

En un estudio reciente de pacientes con escleroderma, en el que midieron anticuerpos anti-Scl-70 observaron que éstos, tienen una sensibilidad para el diagnóstico de 34% [6], sin embargo, la especificidad observada fue de 98%. La escleroderma puede ser clasificada en dos categorías: la forma limitada en la cual los pacientes tienen mejor pronóstico; y la forma difusa. La forma limitada se asocia más frecuentemente con la presencia de anticuerpos que muestran el patrón anti-centrómero en la prueba de AAN detectados mediante IFI usando como sustrato células HEp-2. La forma difusa de la enfermedad se asocia con la presencia de anti-ADN-topoisomerasa I (anti-Scl-70) o AAN con patrón nucleolar [7].

Otro tipo de anticuerpos asociados a enfermedades autoinmunes son los anticuerpos anti-nucleolares, entre los que se encuentran: los anti-PM-Scl, anti-RNA Polimerasa I-III, anti-U3-RNP y anti-Th/To. Este grupo de anticuerpos se presentan con mayor frecuencia en pacientes con escleroderma, LEG, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide (AR) y fenómeno de Raynaud [8].

En hepatitis autoinmune, la presencia de AAN es parte integral del diagnóstico. Los pacientes con fenómeno de Raynaud pueden tener diversas enfermedades subyacentes, la presencia de AAN en estos pacientes aumenta la posibilidad de que dicha manifestación clínica esté asociada con una enfermedad autoinmune generalizada [9].

En la tabla 2.1 se muestran los diferentes autoanticuerpos, los antígenos reconocidos y las enfermedades asociadas a la presencia de éstos.

AAN	Localización	Antígenos reconocidos	Enfermedades
Anti-DNAcs		DNAcs	LEG
Anti-DNAcd		DNAcd	LEG
Anti-poliADP-ribosa	Cromatina	Poli ADP ribosa	LEG
Anti-Scl-70		DNA Topoisomerasa I	CREST
Anti-centrómero		Centrómeros	Lupus inducido por fármacos
Anti-histonas		Histonas	LEG
Anti-U1 RNP		U1 RNP	EMTC
Anti-Sm		U1, U2, U4-U6, U5 RNP	LEG
Anti-U2 RNP		U2 RNP	Síndrome de sobreposición
Anti-SSA/Ro	Núcleo	hY1~hY5 RNP	SSj
Anti-SSB/La		RNA polimerasa III: Factor de terminación de transcripción	LEG
Anti-PCNA		DNA polimerasa de la factor auxiliar δ	LEG
Anti-Ku		Proteínkinasa DNA dependiente	Síndrome de sobreposición
Anti-U3-RNP		U3-RNP (Fibrilarina)	Esclerosis generalizada
Anti-7-2 (Th) RNP		RNasa P, RNasa MRP	Esclerosis generalizada
Anti-RNA polimerasa I	Nucleolo	RNA polimerasa I	Esclerosis generalizada
Anti-PM-Scl		Complejo de 11 proteínas (20-110 KD)	Síndrome de sobreposición
Anti-NOR-90		hUBF (Factor de unión 5' a 3' humano)	Esclerosis generalizada

Tabla 2.1 Antígenos reconocidos, localización celular y enfermedades relacionadas con los anticuerpos anti-nucleares.

2.1.2 Detección de Anticuerpos Antinucleares

Los AAN se detectan habitualmente por una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como substrato células HEP-2 (línea celular de carcinoma de laringe humano). El título de los anticuerpos es la máxima dilución del suero observado en la fluorescencia y el patrón de tinción, si bien es tenue aun es claro.

La positividad de los AAN depende del patrón de fluorescencia observado, como lo muestran *Rosas I. et al* [10], en donde se deben tener en cuenta que los autoanticuerpos están presentes no sólo en enfermedades

autoinmunes generalizadas, sino también en procesos autoinmunes órgano específicos, infecciones, neoplasias e incluso en población sana (Tabla 2.2) [4].

La presencia de AAN a títulos mayores a 1:640 en un paciente sin evidencia clínica de enfermedad autoinmune es motivo de seguimiento constante, hasta descartar desarrollo o evolución de alguna enfermedad autoinmune.

Enfermedad	AAN positivos (%)
Enfermedades autoinmunes sistémicas	
• LEG	95-100
• Lupus inducido por fármacos	~100
• Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo	~100
• Esclerodermia	60-80
• Síndrome de Sjögren	50-75
• Polimiositis/dermatomiositis	50-60
• Artritis juvenil	50-70
• Artritis reumatoide	30-50
Enfermedades autoinmunes órgano específicas	
• Hepatitis autoinmune	~100
• Enfermedad de Graves	50
• Tiroiditis de Hashimoto	40-50
• Hipertensión pulmonar primaria	40
• Enfermedad de Addison	30
• Esclerosis múltiple	25
• Púrpura trombocitopenia autoinmune	10-30
Otras enfermedades	
• Fibromialgia	15-25
• Pacientes con implantes de silicona	15-25
• Infecciones crónicas: endocarditis, tuberculosis, mononucleosis	Variable
• Neoplasias sólidas y hematológicas	Variable
• Fármacos: hipotensores, antibióticos, agentes biológicos	Variable
Sujetos sanos	
• Especialmente mujeres y adultos mayores	5

Tabla 2.2. Prevalencia de AAN positivos en diferentes padecimientos y en la población normal.

La detección de AAN tanto naturales como infecciosos y patogénicos se basa en métodos de tamiz que permiten la unión específica de los autoanticuerpos a componentes de la célula (vg, tejidos, líneas celulares, antígenos purificados, etc.) seguido del uso de compuestos que hagan evidente la reacción antígeno-anticuerpo (fluoróforos, como el isotiocianato de fluoresceína [FITC] o isotiocianato de tetrametilo-rodamina, etc.).

Los resultados se utilizan como ayuda para el diagnóstico, pronóstico, seguimiento y tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunes.

2.1.3 Patrones de Inmunofluorescencia Indirecta Observados en Células HEp-2

Los patrones de tinción detectados mediante IFI pueden ser utilizados para inferir el o los antígenos reconocidos por los autoanticuerpos presentes en la muestra, aplicando el conocimiento que existe acerca de qué autoantígenos son reconocidos o se encuentran en una estructura de la célula en particular. Así, una técnica simple como la IFI en la que se usan células HEp-2 como sustrato (la cual tienen una especificidad entre 91-93 % y una sensibilidad que depende del microscopio empleado [11]) es utilizada para inferir posibles antígenos específicos, los cuales posteriormente pueden ser confirmados mediante ensayos más sensibles y específicos (vg. ensayos inmunoenzimáticos, radioinmunoensayos, electroinmunotransferencia, etc. [12]).

La detección de AAN mediante IFI permite identificar una serie de patrones de tinción en los que, de acuerdo a las características que presentan, se pueden inferir autoantígenos específicos del núcleo, del citoplasma y de las membranas nucleares y citoplásmicas.

De acuerdo a lo anterior, estos patrones de tinción pueden tener las siguientes características:

- ♦ **Patrón Nuclear:** Tinción de los componentes del núcleo.
- ♦ **Patrón Citoplasmático:** Tinción que se localiza en el citoplasma.

Los patrones de fluorescencia se reportan tomando en cuenta las características de las tinciones observadas y la máxima dilución hasta la cual son positivos. En la tabla 2.3 se muestran los patrones más comunes de tinción que se pueden observar por la presencia de AAN, detectados mediante IFI usando como sustrato células HEP-2.

Nucleares	Citoplasmáticos
Homogéneo	Mitocondrial
Periférico	Ribosomal
Centromérico	Jo-1
Moteado Grueso	Lisosomal
Granular	Aparato de Golgi
Nucleolar	Actina
PCNA	Citoqueratina
Na	Vicentina
Laminar nuclear	
Anti-complejo de los poros nucleares	
Anti-antígenos del ciclo celular	
Anti-aparato mitótico	
Moteado fino	

Tabla 2.3 Patrones de inmunofluorescencia más comunes observados en células HEP-2.

2.1.3.1 Características de los Patrones de Tinción Detectados Mediante IFI

Los principales patrones de inmunofluorescencia se indican en la tabla 2.4, aunque su interpretación tiene algunos problemas. El reconocimiento de un patrón específico depende en gran medida de la experiencia del observador. Cuando se diluye el suero problema pueden aparecer otros patrones de fluorescencia. Esto significa que algunos patrones pueden enmascarar el reconocimiento de otros patrones que se ponen de manifiesto al diluir más el suero del paciente. Los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunes generalizadas como LEG pueden presentar diferentes patrones de IFI.

Patrón	Antígenos	Enfermedades
Homogéneo (difuso)	Complejos Histonas-DNA(nucleosoma)	LEG, Lupus inducido por fármacos
Periférico	dsDNA	LEG, Hepatitis autoinmune
Moteado	Sm, RNP, Ro/SSA, La/SSB, Scl-70, RNA polimerasa, otros	LEG, síndrome de Sjögren, EMTC, Esclerodermia
Moteado polimorfico	Antígeno celular de células proliferante	LEG
Centromérico	Cinetocoro	Esclerodermia limitada, fenómeno de Raynaud, cirrosis biliar primaria
Nucleolar	RNA nucleolar	Esclerodermia, esclerodermia-miositis
Citoplasmáticos	Histidil-Trna sintetasa(Jo-1), Pribosomal, mitocondrias	Polimiositis, LEG, cirrosis biliar primaria

Tabla 2.4 Patrones de inmunofluorescencia de los AAN y sus principales antígenos blanco

Los patrones de AAN sugieren que son reconocidos múltiples antígenos por los diferentes autoanticuerpos, por lo que, la prueba de IFI es generalmente usada como primera prueba para la detección de autoanticuerpos. En la figura 2.1 se muestran algunos de los patrones más representativos.

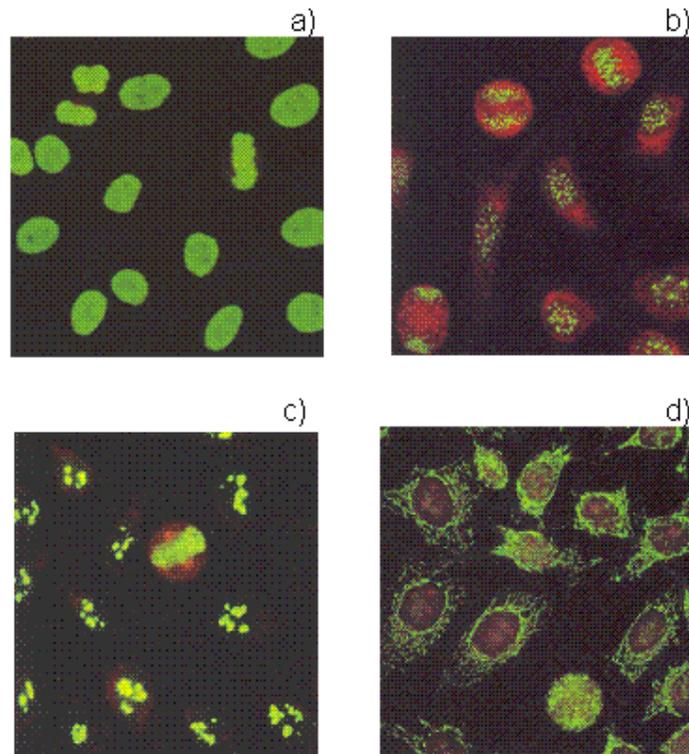


Figura 2.1. Patrones nucleolares y citoplasmáticos de inmunofluorescencia en células HEP-2. **(a)** Patrón homogéneo. Los antígenos reconocidos son: nucleosomas, DNAc, histonas y DNAs; **(b)** Patrón centromérico. Los antígenos reconocidos son las proteínas de los centrómeros: CENP-A a CENP-F; **(c)** Patrón nucleolar. Los antígenos reconocidos son: DNA topoisomerasa I (Scl-70), PM-Scl, NOR-90 y RNA polimerasa I. **(d)** Patrón mitocondrial. Los antígenos reconocidos son: componentes de las caras interna y externa de las mitocondrias incluyendo fosfolípidos.

2.1.3.2 Patrones Moteado Fino y Grueso

El patrón moteado como se describió originalmente, lo caracterizaba la presencia de puntos fluorescentes en el nucleoplásmo. Lo describían como anticuerpos dirigidos contra las proteínas nucleares. En 1962 Eng M Tan [13] estudió el suero de una paciente con lupus e identificó el antígeno Sm. Este fue el primer autoantígeno nuclear no histona caracterizado bioquímicamente. Tan mostró que este antígeno no era DNA ni nucleoproteína y que se encontraba presente en el núcleo de una amplia variedad de tejidos de origen humano y bovino.

Posteriormente se fueron describiendo otros autoanticuerpos dirigidos contra antígenos celulares tanto nucleares como citoplasmáticos, los cuales se han asociado con diferentes enfermedades autoinmunes como: síndrome de Sjögren, EMTC, dermatiomiositis, poliomiocitis y lupus inducido por fármacos. Estos anticuerpos reconocen proteínas nucleares no histonas, conocidas como ENAs por sus siglas en inglés extractable nuclear antígenos.

De acuerdo con los datos reportados en la literatura y los nuestros, los patrones moteados son el producto del reconocimiento de autoantígenos nucleares no histonas. El tamaño de las partículas reconocidas puede variar, así como su aspecto, el cual puede ser uniforme o muy irregular; por tal motivo se han clasificado en:

(a) Patrón moteado granular. Este patrón se caracteriza por presentar puntos fluorescentes en todo el nucleoplasma, sin tinción de la cromatina en la fase de división del ciclo celular. Está asociado principalmente con el reconocimiento de ribonucleoproteínas heterógenas nucleares (hnRNP). El tamaño de los puntos fluorescentes puede variar y frecuentemente es conocido como granular.

(b) Patrón moteado grueso. En este patrón se observa el núcleo teñido con gránulos finos o gruesos, la tinción depende del título de los autoanticuerpos (Figura 2.2). Las características del patrón moteado grueso son:

- Núcleo teñido con gránulos finos o gruesos.
- Nucleolos positivos.
- Tinción en la metafase negativa.

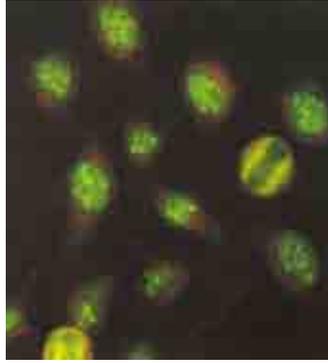


Figura 2.2. Patrón moteado grueso, los antígenos característicos son las llamadas ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs).

(c) Patrón moteado fino. En el se observa el núcleo teñido con gránulos finos o gruesos, la tinción depende del título de los autoanticuerpos (Figura 2.3). Las características son:

- Núcleo teñido con gránulos finos o gruesos.
- Nucleolos negativos.
- Tinción en la metafase negativa

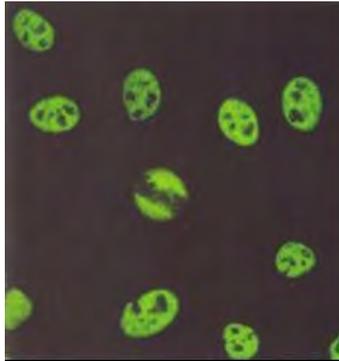


Figura 2.3 Patrón moteado fino, los antígenos reconocidos en este patrón son: U1 RNP (de 68, 34 y 23 kD), Sm (proteínas U1, U2, U4/U6 y U5) componentes de Sm B'/B (29kD/28kD), D (16kD), E (12kD), F(11kD) y G(10kD), U2RNP, U1U2RNP, hmRNP, SS-A/Ro.

(c) Patrón moteado fino denso. La inmunofluorescencia se muestra con gránulos finos o densos que están distribuidos de manera difusa en el nucleoplasma, también se pueden observar puntos localizados en la placa de la cromatina en las fase mitótica, principalmente por la presencia del antígeno DFS70 [14].

(d) Patrón nuclear de células en proliferación (PCNA). Se caracteriza por la presencia de múltiples patrones de tinción en un mismo campo, dependiendo de la fase en la que se encuentren las células. La tinción en la fase G1 es granular con motas gruesas y tinción de los nucleolos. La tinción en la fase G1 tardía es homogénea. En la fase S se ve una tinción granular fina sin tinción de los nucleolos y en división no se observa reconocimiento de la cromatina, es decir es metafase negativa. Los anticuerpos anti-CENP-F son algunas veces reportado como anti-PCNA, sin embargo, la observación en profase y metafase permite hacer la diferenciación con el patrón anti-PCNA [14].

(e) Patrón punteado nuclear. Los anticuerpos que dan los patrones punteados son: anti-p80 coilin, anti-Sp-100 y anti-Jo-1. La presencia de los dos primeros correlaciona con cirrosis biliar primaria [14]. Cuando los puntos detectados en el núcleo van de 1 a 6 sugieren el reconocimiento de las partículas p80 coilin en tanto que, cuando se cuentan entre 7 y 24 sugieren el reconocimiento de las partículas Sp-100.

(f) Patrón moteado discreto o centromérico. Los gránulos que se presentan en este patrón se observan en el núcleo de las células en interfase. Las células en fase mitótica muestran gránulos en los cromosomas condensados (figura 2.5). Este patrón tiene una alta frecuencia en pacientes con esclerosis sistémica, en el (síndrome de Crest).

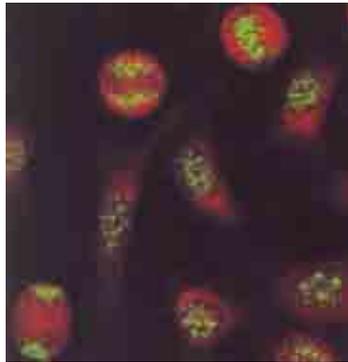


Figura 2.5. Patrón centromérico, los antígenos que se reconocen son las proteínas del centrómero: CENP-B (80kDa), CENP-A (17kDa), CENP-C (140kDa).

Los patrones centromérico y PCNA son fácilmente identificables por la tinción que producen en células en división y su asociación con manifestaciones clínicas.

No obstante a lo anterior, en la actualidad los patrones moteados gruesos y finos generan gran confusión ya que en algunos trabajos solo los refieren como patrones moteados y en otros los clasifican en moteado fino o moteado grueso [15, 16]. Ambos patrones ocupan el segundo lugar con mayor frecuencia detectados mediante la técnica de IFI de ahí que surja la importancia al momento de su caracterización [17].

Tanto el patrón moteado fino como el moteado grueso se correlacionan con enfermedades como: EMTC, LEG, síndromes de sobreposición, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren y artritis reumatoide [18], sin embargo, como ya se mencionó no existe un patrón de tinción observado en células HEp-2 que sea específico de cada una de las enfermedades mencionadas. Lo anterior confirma que un patrón de IFI es una guía importante del o los posibles antígenos que pueden estar siendo reconocidos por los AAN, así que el siguiente paso debe ser la determinación del antígeno por medio de otras técnicas de laboratorio.

En el presente trabajo se hizo la caracterización inmunoquímica de los patrones moteado fino y grueso por medio de la técnica electroinmunotransferencia (Western blot) para caracterizar reactividades específicas, así como investigar si existe correlación con las diferentes enfermedades autoinmunes.

3. JUSTIFICACIÓN

Por la información que proporciona la detección de anticuerpos anti-nucleares (AAN) mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), se ha sugerido como la primera prueba de laboratorio que apoya el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. La detección de AAN por IFI permite la identificación de múltiples patrones de tinción en los que, de acuerdo a las características que presentan, se puede el reconocimiento de autoantígenos específicos del núcleo, del citoplasma y/o de las membranas nucleares y citoplásmicas.

Los patrones moteados fino y grueso generan confusión al momento de su identificación. Este estudio sugiere la caracterización de dichos patrones mediante electroinmunotransferencia, la cual es una técnica más sensible y específica, que permite conocer la reactividad de los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes que dan dichos patrones.

4. OJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Identificar los antígenos que reconocen los anticuerpos que dan los patrones moteado fino y grueso.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estandarizar la técnica de electroinmunotransferencia (EIT) para que pueda ser utilizada para el reconocimiento de los componentes que caracterizan los patrones moteado fino y grueso.
2. Correlacionar los patrones moteado fino y grueso con las diferentes enfermedades autoinmunes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Pacientes y Criterios de Inclusión

Pacientes que acudieron al Servicio de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en el periodo comprendido entre el 14 de julio y el 28 de noviembre de 2008, a los cuales se les solicitó determinación de AAN por el método de IFI y que resultaron positivos con patrones moteado fino y grueso con títulos mayores a 1:640.

5.2 Estrategia de estudio

Detección de AAN por el método de IFI con laminillas que tienen adheridas células HEp-2 fijadas con etanol. Una vez que se caracterizó el patrón de tinción nuclear, se caracterizaron los antígenos reconocidos mediante electroinmunotransferencia (Western blot) para identificar los antígenos blanco de los anticuerpos que dan los patrones moteado fino y patrón moteado grueso.

5.3 Muestras

Obtuvimos suero a partir de muestras de sangre total de los pacientes que acudieron al Servicio de Inmunología y Reumatología para la detección de AAN por IFI en el periodo antes mencionado.

5.4 Reactivos y Materiales

5.4.1 Inmunofluorescencia Indirecta

Equipo de la marca The Binding Site el cual contienen:

- Instructivo
- Portaobjetos con células HEp-2 fijadas con alcohol
- Calibrador
- Suero control positivo y negativo
- Anticuerpo prediluido, listo para usarse anti-IgG humano, producido en cabra, purificado por afinidad, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Contiene 0.001 % de azul de Evans. Marca MBL International, Catalogo: RG-AN003-D.
- Amortiguador de fosfatos (PBS)
- Medio de montaje
- Cubreobjetos

5.4.2 Inmunotransferencia (Western Blot)

Equipo de la marca EUROIMMUN. Anti-HEp-2 cell antigen EUROLINE-WB (IgG). Cat. DW 1520-3001-3G. Contiene:

- Instructivo
- Tiras de papel de nitrocelulosa con antígenos recombinantes CENP B, SS-A nativo (60 kDa) y Ro-52 recombinantes y lisados nucleares de células HEp-2 plus.
- Tira analítica control incubada con control positivo.
- Enzima conjugada a una concentración 10x de anti-IgG humana.
- Amortiguador de fosfatos 10x.
- Solución de sustrato NBT/BCIP listo para usarse.

- Placa de incubación con carriles.

5.5 Fundamento

5.5.1 Inmunofluorescencia Indirecta

Las laminillas con células HEp-2 fijadas con alcohol (metanol o etanol), las cuales son el sustrato que se utiliza para la detección de los AAN por el método de IFI. Las muestras de pacientes, calibradores, controles positivo y negativo, se incuban con el sustrato. Los anticuerpos que no reaccionan con los antígenos de los componentes del núcleo y/o citoplasma son eliminados mediante lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Los anticuerpos unidos a los antígenos se identifican con un segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El conjugado no unido se elimina con un segundo ciclo de lavados con PBS. La unión de los anticuerpos de conejo, conjugados con FITC, a la región Fc de los anticuerpos humanos que reconocieron antígenos en las células HEp-2 muestran patrones de tinción que se observan en el microscopio de epifluorescencia. La figura 5.1 muestra los pasos que se siguen para realizar la inmunofluorescencia indirecta.

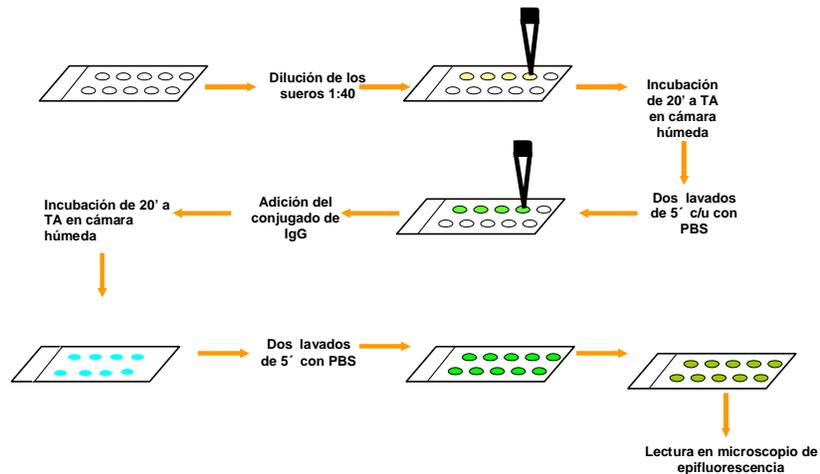


Figura 5.1 Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta

5.5.2 Electroinmunotransferencia (Western blot).

Las tiras analíticas de papel de nitrocelulosa que contienen los antígenos de las células HEp-2 se incuban con las diluciones de los sueros de los pacientes. Cada tira contiene, en uno de los extremos, otra pequeña tira sobrepuesta del mismo material con los antígenos: CENP-B recombinante, SS-A nativo (60 kDa) y Ro-52 recombinante. Para el análisis de las muestras, primero se bloquean y se incuban las tiras con la solución amortiguadora de fosfatos a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación constante. Al término de la incubación se aspira la solución, se agregan las muestras previamente diluidas 1:51 en la solución amortiguadora de fosfatos y se incuban durante 60 minutos con agitación constante. Se aspira la muestra y se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de amortiguadora de fosfatos. Las muestras que contienen anticuerpos específicos de clase IgG (pueden contener también anticuerpos de isotipos IgA o IgM, sin embargo solo detectamos por esta metodología los autoanticuerpos de isotipo IgG), la detección del complejo antígeno-anticuerpo se hace mediante una segunda

incubación con anticuerpos anti-IgG's humanos conjugados con la enzima fosfatasa alcalina, la cual actúa sobre el sustrato NBT (cloruro de nitro-azul de tetrazolio)/BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato), los cuales forman un precipitado negro púrpura muy intenso, el cual deja una mancha en el sitio de la reacción, en un tiempo aproximado de 10 minutos.

El exceso de enzima se elimina con 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada. La reacción se detiene aspirando el sustrato y lavando las tiras analíticas con agua destilada.

Las tiras son analizadas usando la hoja de evaluación que contiene el equipo. En la figura 5.2 se muestra el esquema que se utiliza para la lectura de las tiras.

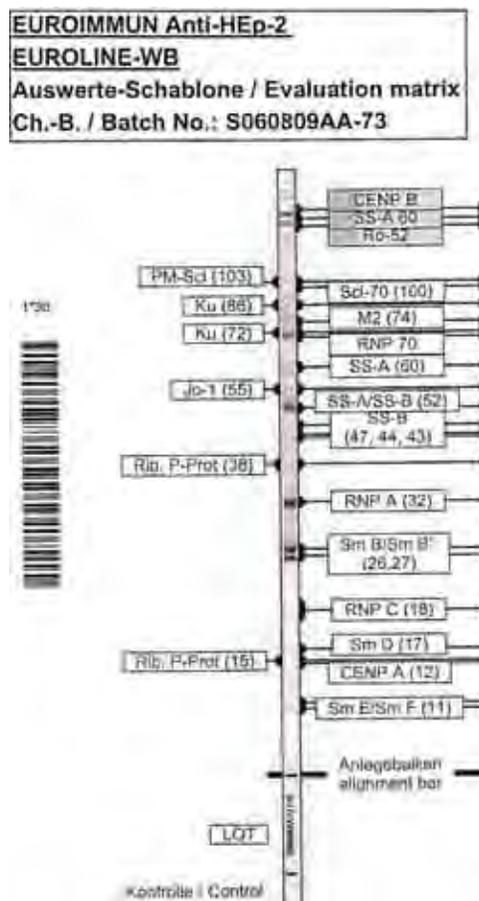


Figura 5.2 Esquema con lo que se realiza la lectura de las muestras.

6. RESULTADOS

6.1. Características demográficas

De los 64 sueros de pacientes estudiados 62 (96.9%) correspondieron al género femenino y 2 (3.1%) al masculino. La edad promedio fue de 44.7 años \pm 15.9 [Fig. 6.1].

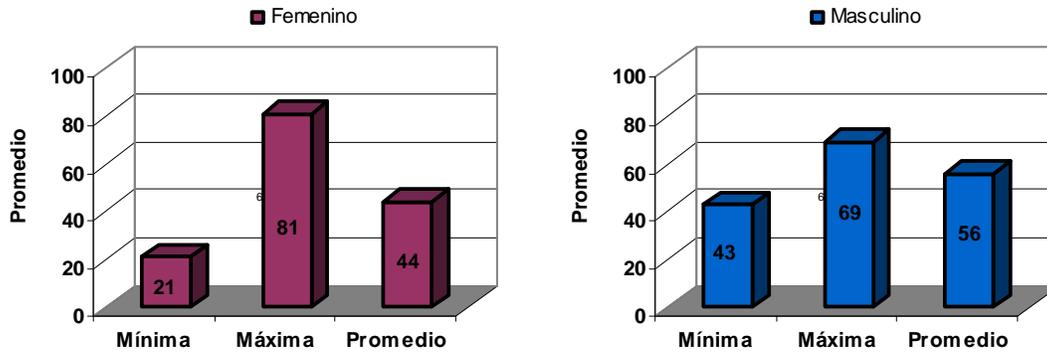


Figura 6.1 Distribución por género de las edades de los pacientes estudiados.

La distribución de los patrones de fluorescencia observados fue: 42 casos (65.6%) presentaron patrón moteado fino (MF) y 22 (34.4%) moteado grueso (MG). En la figura 6.2 se muestra la distribución de los patrones de IFI observados.

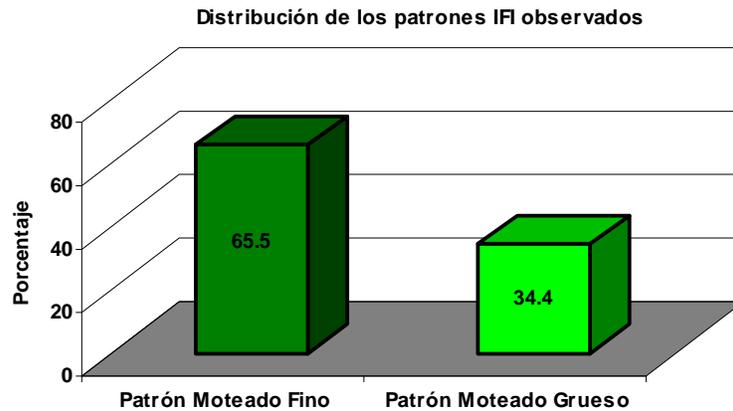


Figura 6.2 Distribución de los patrones de inmunofluorescencia.

La figura 6.3 muestra la distribución de los títulos observados por patrón. La distribución de frecuencias de los títulos de anticuerpos por patrones mostró que para el patrón moteado fino 11 de las 42 muestras (26%) tuvieron un título de 1:640, 16 de las 42 muestras (38%) 1:1280, solo 4 de las 42 muestras (10%) tuvieron un título 1:2560 y 11 de los 42 sueros presentaron títulos de 1:5120. En cuanto al patrón moteado grueso la frecuencia observada para el título 1:640 fue de 14 de las 22 muestras (64%), solo 4 de 22 muestras (17%) tuvieron título de 1:1280, 3 de los 22 (13%) presentaron título de 1:2560 y sólo un suero de las 22 muestras (5%) presentó un título de 1:5120.

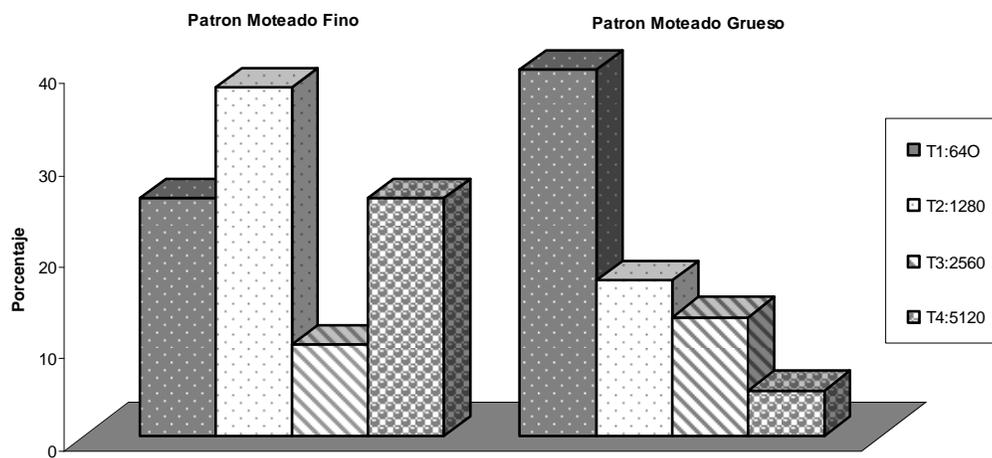


Figura 6.3 Frecuencia de los títulos de anticuerpos observados para los patrones moteado fino y grueso. A) Frecuencia de los títulos encontrados para el patrón moteado fino. B) Distribución de los títulos observados en el patrón moteado grueso.

De las 64 muestras estudiadas que presentaron el patrón moteado fino o grueso, 71% de eran de pacientes con enfermedades autoinmunes, en tanto que, el 29% restantes pertenecían a otras patologías.

Dentro de las enfermedades autoinmunes diagnosticadas estudiadas: 21% tenían diagnóstico de LEG, 14% síndrome de Sjögren, 13% artritis reumatoide, 10% fenómeno de Raynaud, 8% hipotiroidismo autoinmune, 8% hepatitis autoinmune, 6% escleroderma, 3% espondilitis anquilosante (EA), 3% síndromes de sobreposición, 3% anemia hemolítica autoinmune (AHA), 3% EMTC, 3% síndrome de anti-fosfolípidos (SaF), 2% mielitis longitudinal autoinmune, 2% esclerosis múltiple y 2% síndrome de Evans (figura 6.4).

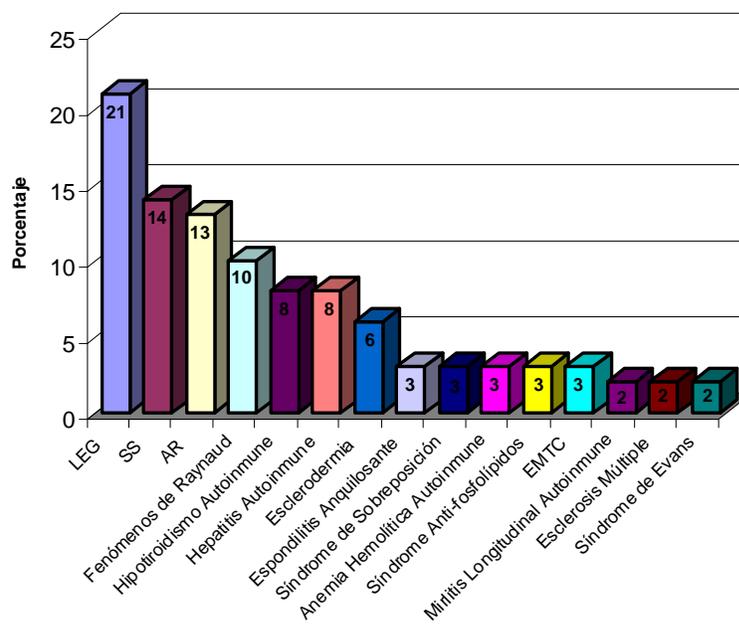


Figura 6.4. Diagnóstico de los pacientes incluidos en el estudio.

El diagnóstico de los pacientes no autoinmunes fue: 62% cirrosis hepática, 12% poli-artritis simétrica, 6% Linfopenia, 6% flogosis, 6% estenosis colorrectal y 6% donador de riñón clínicamente sano (figura 6.5).

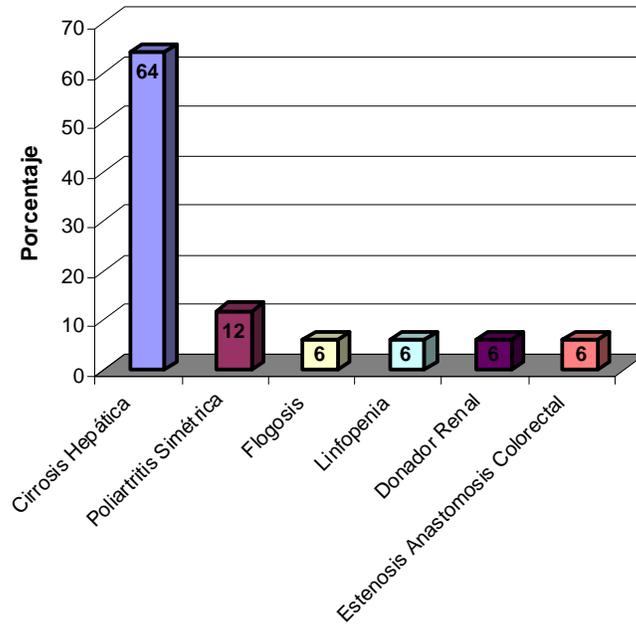


Figura 6.5 Distribución de las patologías no autoinmune incluidas en el estudio.

La distribución de los patrones de inmunofluorescencia observados en los 64 sueros fue clasificada en función de las patologías diagnosticadas. 11 de los 13 pacientes (85%) con diagnóstico de LEG tuvieron anticuerpos en circulación que dieron un patrón moteado fino, en tanto que, solo 2 (15%) de los 13 mostraron un patrón moteado grueso. Cabe mencionar que los 11 sujetos que dieron patrón moteado fino, tenían como diagnóstico LEG sin otra enfermedad concomitante, sin embargo, los dos pacientes que dieron patrón moteado grueso su diagnóstico no solo era el de LEG también, presentaban manifestaciones clínicas de otras enfermedades. Ambos tenían LEG, escleroderma y síndrome de Sjögren.

En los pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren se observó que 5 de 9 (55%) mostraron un patrón moteado fino, en tanto que, sólo 4 de los 9 (45%) dieron patrón moteado grueso.

Ocho de los pacientes estudiados tuvieron diagnóstico de AR, 6 de estas muestras 6 (75%) dieron patrón moteado fino y solo 2 (25%) moteado grueso. Estos 2 pacientes tenían registrado en su expediente que además del diagnóstico de AR tenían manifestaciones clínicas de síndrome de Sjögren, EMTC y fenómeno de Raynaud secundario.

De los pacientes con fenómeno de Raynaud secundario 4 de 6 (67%) mostraron un patrón moteado fino y 2 de los 6 (33%) patrón moteado grueso. Tres de los 5 (60%) pacientes con hepatitis autoinmune dieron patrón moteado fino y solo 2 (40%) moteado grueso. Los pacientes con diagnóstico de hipotiroidismo autoinmune todos (5/5, 100%) presentaron patrón moteado fino. De los pacientes con esclerodermia, 1 de 4 (25%) presentó patrón moteado fino y 3/4 (75%) moteado grueso. Las muestras de los pacientes con EMTC, 1 de 2 (50%) y 1 de 2 (50%) con espondilitis anquilosante dieron patrón moteado fino, y la otra dio patrón moteado grueso. Las muestras de los pacientes con esclerosis múltiple (n=1), síndrome anti-fosfolípidos (n=2), mielitis transversa longitudinal (n=1) y anemia hemolítica autoinmune (n=2) todas presentaron el patrón moteado fino. Los sueros de los pacientes con síndrome de sobreposición (n=2) y con síndrome de Evans (n=1) todos dieron patrón moteado grueso (Figura 6.6).

Distribución de los patrones de inmunofluorescencia en las diferentes enfermedades autoinmunes

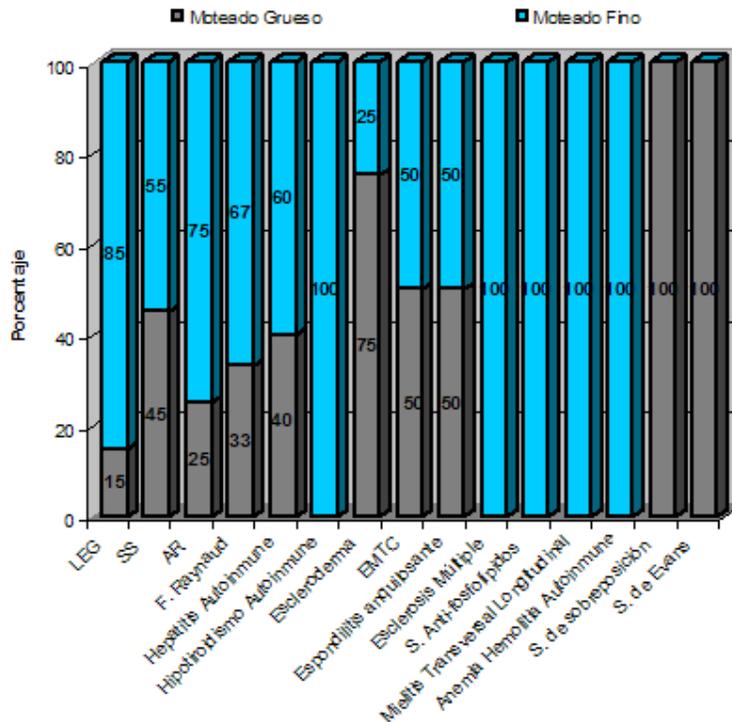


Figura 6.6. Frecuencia de AAN que dieron patrón moteado grueso y fino en los pacientes con enfermedades autoinmunes.

En cuanto a las muestras de los pacientes con enfermedades no autoinmune, la clasificación de acuerdo a los patrones de IFI mostró que los pacientes con cirrosis hepática 5 de 10 (50%) dieron patrón moteado grueso y los otros 5 (50%) moteado fino. Los pacientes con flogosis (n=1) y linfopenia (n=1) presentaron patrón moteado fino. Los pacientes con poliartritis simétrica (n=2), el donador de riñón (n=1) y el paciente con estenosis anastomosis colorrectal (n=1) presentaron patrón moteado grueso. En la figura 6.7 se muestra la distribución de los patrones en cada una de las patologías.

Distribución de los patrones de inmunofluorescencia en enfermedades no autoinmunes

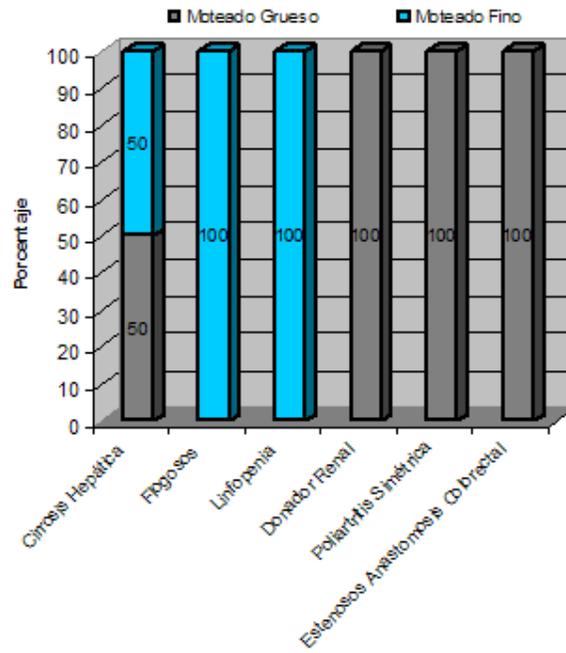


Figura 6.7 Frecuencia de patrones moteado grueso y fino en pacientes con enfermedades no autoinmunes.

6.2 Caracterización Inmunoquímica de la Reactividad de las Muestras que Dieron Patrones Moteado Fino y Grueso Contra Componentes Nucleares Mediante Electroinmunotransferencia (EIT)

6.2.1 Patrón Moteado Grueso

Una vez clasificadas las muestras por el patrón moteado observado, procedimos a caracterizar su especificidad mediante EIT. Los resultados muestran que el 36% de los sueros de los pacientes que dieron patrón moteado grueso por IFI reconocieron el antígeno Ro-52 recombinante, 32% reconocieron CENP-B recombinante, 14% reconocieron los antígenos P-ribosomales (P1 y P2) y 14% el antígeno SS-A nativo de 60 kDa. Además, 9% de las muestras reconocieron el antígeno Ku de 86 kDa, 9% reconocieron Jo-1 y 9% SS-A de 52 kDa. La menor reactividad contra antígenos específicos en este patrón de IFI fue contra: AMA-M2, SS-A 60 kDa, SS-B 44, SS-B de 44 kDa y P-ribosomal (P0) [figura 6.8].

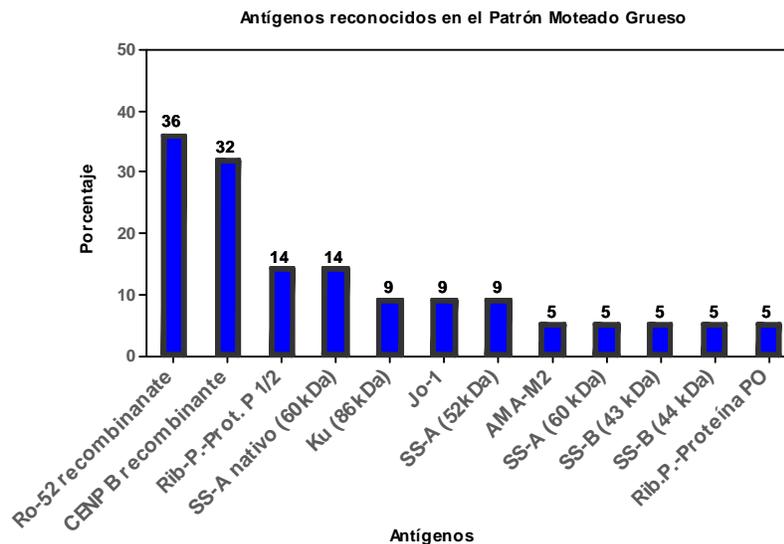


Figura 6.8. Reactividad de las muestras que dieron patrón moteado grueso.

Además de las proteína específicas, tanto nucleares como citoplásmicas, los sueros que dan patrón moteado grueso, reaccionaron contra proteínas no especificadas en las tiras de nitrocelulosa de la EIT. La tabla 6.1 muestra la ubicación de las bandas.

No de Bandas	Ubicación	%
1	Entre Ro-52 recombinante y PM-Scl (PM-1)	23
1	Entre Scl-70 y Ku 86 kDa	23
1	Entre RNP y SS-A 60 kDa	18
1	Entre RNP A y SmB/SmB' (26/27 kDa)	18
1	Entre RNP y SS-A 60 kDa	10
1	Entre SS-A 60 kDa y Jo-1	9
1	Entre Jo-1 y SS-A/SS-B 52 kDa	9
1	Entre SmD y Rib-P.-Prot.P ½	9
1	Entre SS-A/SS-B 52 kDa y SS-B 47 kDa	5
1	Entre SS-B y Rib.P.-Proteína PO	5
1	Entre CENP-A y SmE/F'	5

Tabla 6.1 Frecuencias de antígenos específicos no identificados en el patrón moteado grueso.

6.2.2 Patrón Moteado Fino

Las muestras de los pacientes que dieron patrón moteado fino reconocieron los siguientes antígenos: 55% SS-A de 60 kDa nativo, 55% Ro-52 recombinante; 14% reconocieron el antígeno Ku de 72 kDa, 12% SS-A de 52 kDa. 10 % de las muestras reconocieron CENP-B recombinante, AMA-M2, RNP de 70 kDa y RNP A de 32 kDa. 7% de las muestra el antígeno PM-Scl (PM-1), Ku de 86 kDa, SS-A de 60 kDa, SS-A/SS-B, SS-B de 43 kDa, P-ribosomal (proteínas: P0, P1 y P2) (figura 6.9). Los antígenos contra los que reaccionaron con menor frecuencia (2%) fueron: Scl-70, Jo-1, SS-B de 47 y 44 kDa, SmB/SmB' de 27/26 kDa, RNP-C, Sm D, Sm E y Sm F (figura 6.9).

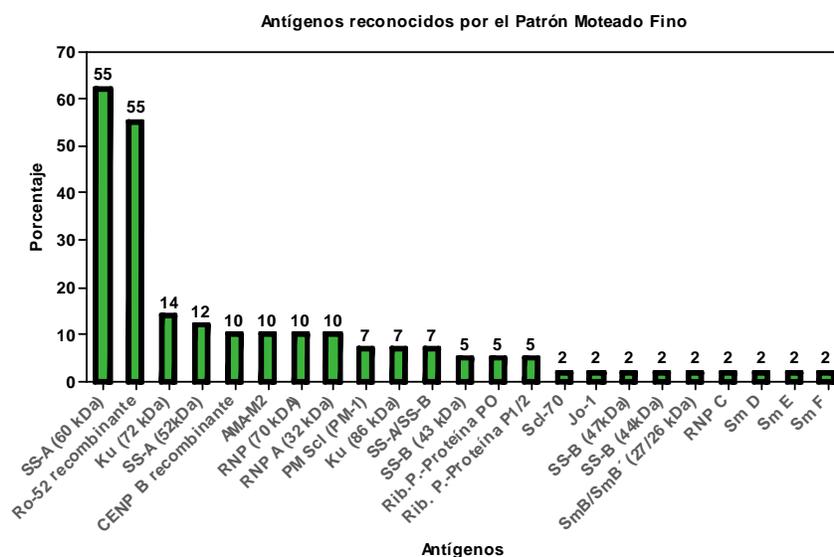


Figura 6.9. Reactividad de las muestras que dieron patrón moteado fino

Además de las proteínas específicas, como observamos en el patrón moteado grueso, los sueros que dan patrón moteado fino reaccionaron contra proteínas no especificadas en las tiras de nitrocelulosa de la EIT. La tabla 6.2 muestra la ubicación de las bandas.

No de Bandas	Ubicación	%
1	Entre el antígeno Jo-1 y SS-A/SS-B 52 kDa	19
1	Entre SS-A 60 kDa y Jo-1	14
1	Entre SS-B 43 kDa y Rib. P.-Proteína PO	12
1	Entre RNP A y SmB/SmB' (26/27 kDa)	12
1	Entre Ro-52 recombinante y PM-Scl (PM-1)	10
1	Entre Ku 86 kDa y AMA-M2	10
1	Entre RNP y SS-A 60 kDa	10
1	Entre CENP A y SmE/F	10
1	Entre SS-A y Jo-1	5
1	Entre Rib. P.-Proteína PO y RNP A	5
1	Entre Scl-70 y Ku 86 kDa	2
1	Entre RNP A y SmB 26 kDa	2
1	Entre SmD y Rib.-Prot. P1/2	2

Tabla 6.2 Frecuencias de antígenos específicos no identificados en el patrón moteado fino.

6.3 Clasificación de los Antígenos Reconocidos en los Sueros de Pacientes con Enfermedades Autoinmunes que Dieron Patrón Moteado Grueso o Moteado Fino.

6.3.1 Patrón Moteado Grueso

De las 22 muestras que dieron patrón moteado grueso, 14 eran de pacientes con alguna enfermedad autoinmune. En dichas muestras se observó reactividad solo contra los antígenos: CENP B recombinante, SS-A (60 kDa), Ro-52 recombinante, ku (86 kDa), Jo-1, SS-A/SS-B, SS-B (47 kDa) y Rib.P0, P1 y P2. La tabla 6.3 muestra la frecuencia de reactividad de los sueros contra los antígenos específicos por enfermedad.

Antígeno	Porcentaje de los diferentes antígenos reconocidos en el patrón moteado grueso en distintas enfermedades autoinmunes					
	A.R	S.Sj	F. Rauynaud	Hepatitis Autoinmune	S. Sobreposición	S. Evans
CENP B recombinante	50	33.3	33.3	100		100
SS-A (60 kDa) nativo	50					
Ro-52 recombinante		66.6	66.6		100	100
Ku (86 kDa)		33.3		50	100	
Jo-1	50		33.3			
SS-A/SS-B						
SS-B (47 Kda)			33.3			
Rib.P.-Prot.P1/2	50	33.3	33.3			100

Tabla 6.3 Antígenos reconocidos por diferentes enfermedades autoinmunes en el patrón moteado grueso.

De las 9 muestras restantes, 5 pertenecieron a pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática, las cuales mostraron reactividad hacia los siguientes antígenos: Ro-52 recombinante, AMA-M2, SS-B (43 kDa) y Rib-P.-Prot. P1/2, todos ellos reconocidos en un 40%, mientras que el antígeno CENP B tuvo reactividad de solo un 20 % de las muestras. Por otro lado se obtuvieron 2 pacientes con poli-artritis simétrica, en donde un sujeto solo reconoció el antígeno SS-A (60 kDa), mientras que el segundo reconoció el antígeno RNP (70 kDa).

Para el paciente con estenosis anastomosis colorrectal, solo se observaron 2 bandas inespecíficas: una entre el antígeno Ro-52 recombinante y PM-Scl (PM-1) (103 kDa) y otra entre RNP 70 (kDa) y SS-A (60 kDa). También se obtuvo una muestra de un paciente sano, el cual sería donador renal, este sujeto mostró reactividad hacia el antígeno SS-A (60 kDa) y Ro-52 recombinante.

6.3.2 Patrón Moteado Fino

35 sueros de pacientes incluidos en el estudio dieron patrón moteado fino, todos ellos con diagnóstico de alguna enfermedad autoinmune, en dichas muestras se observó que los antígenos específicos reconocidos fueron: CENP B recombinante, SS-A (60 kDa) nativo. Ro-52 recombinante, PM-Scl(PM-1), Ku (86 kDa), AMA-M2, Ku (72kDa), RNP, SS-A(60 kDa), SS-A(52 kDa), SS-A/SS-B(52 kDa), SS-B (47 kDa), SS-B (43 kDa), Rib.P.-Prot PO, RNP A, Sm B', Sm B, RNPC, Sm D. En la tabla 6.4 se muestra la frecuencia de los antígenos reconocidos específicos para cada una de las enfermedades autoinmunes.

Frecuencia de reconocimiento de los antígenos específicos en los sueros que dan patrón moteado fino de los pacientes con enfermedades autoinmunes									
Antígenos	LEG	AR	S.Sjögren	Hepatitis Autoinmune	Hipotiroidismo Autoinmune	Anemia Hemolítica Autoinmune	EMTC	Mielitis Longitudinal Autoinmune	S. Antifosfolípidos
CENP B recombinante	20	1.7	20				100	100	50
SS-A (60 kDa) nativo	60	33.3	60	67	40	100	50	100	50
Ro-52 recombinante	40	1.7	100	33	60	100	50		
PM-Scl (PM-1)	10		20						
Ku (86 kDa)	30								
AMA-M2			20	33	20				
Ku (72 kDa)	20				20				
RNP	20	1.7			20				
SS-A (60 kDa)		1.7				50		100	
SS-A (52 kDa)	10		20	33			50		
SS-A/SSA-B (52 kDa)	10	1.7	20	67			50		
SS-B (47 kDa)		1.7							
SS-B (43 kDa)			20				50		
Rib P.- Prot. PO	10	1.7				50			
RNP A	10	1.7	20	33					
SmB´	10	1.7							
SmB´	10	1.7							
RNP C		1.7							
Sm D		1.7							
Rib. P.-Prot. 1/2	10								

Tabla 6.4 Antígenos reconocidos en los sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes que dan patrón moteado fino

Para las muestras de pacientes con patologías no autoinmunes, encontramos a 5 sujetos con diagnóstico de cirrosis hepática, las cuales mostraron un mayor reconocimiento hacia el antígeno Ro-52 recombinante en un 40%, mientras que los antígenos CENP-B recombinante, SS-A (60 kDa), AMA-M2 (74 kDa), Ku (72 kDa) mostraron anticuerpos en un 20%. Se obtuvo también un suero de un sujeto con diagnóstico de linfopenia, el cual mostró anticuerpos hacia los antígenos Ro-52 recombinante y RNP A (32 kDa). Por último una muestra de un paciente con diagnóstico de Flogosis, mostró actividad hacia los antígenos, SS-A (60 kDa) nativo, Ro-52 recombinante y SS-A/SS-B (52 kDa).

7. DISCUSIÓN

Por la información que proporciona la detección de anticuerpos antinucleares mediante IFI, esta sigue siendo la primera prueba que apoya el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. La presencia de un patrón nuclear o citoplásmico determina la prueba subsecuente, que representa la búsqueda de autoanticuerpos dirigidos contra uno o más antígenos específicos. La determinación de AAN por inmunofluorescencia permite la identificación de múltiples patrones de tinción en los que, de acuerdo a las características que presentan, se pueden inferir autoantígenos específicos del núcleo, del citoplasma y de las membranas nucleares y citoplásmicas, sin embargo, en la actualidad algunos patrones de IFI como lo son el patrón moteado grueso y moteado fino generan gran confusión, ya que algunos autores solo los refieren como patrón moteado sin darle ningún calificativo posterior específico (vg. grueso o fino), como lo hacen otros autores [15, 16]. La única concordancia que existe entre estos trabajos de investigación es, que en el patrón moteado, independientemente de la clasificación, se reconocen diferentes proteínas no histonas asociadas a RNA o ENA. Además, el patrón moteado como tal [17], es el segundo con mayor frecuencia detectado, solo después del patrón homogéneo, como prueba que apoya el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. Con base en lo anterior surgió la necesidad de una caracterización de este patrón mediante una técnica más sensible y específica, como la EIT, ya que si bien existen diferencias evidentes entre los dos patrones moteados, esta técnica nos permitió establecer la diferencia en los antígenos reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con

enfermedades autoinmunes y que son los responsables de la diferencia entre los patrones de IFI moteado grueso y moteado fino.

Para el presente trabajo, se estudiaron 64 muestras de suero que presentaban patrón moteado fino o grueso. 45 sueros eran de pacientes con diagnóstico de enfermedad autoinmune, 44 fueron de mujeres, confirmando lo reportado en la literatura en relación al predominio de las enfermedades autoinmunes en el género femenino con mayor prevalencia a partir de la tercera década de vida, lo cual sugiere que los factores hormonales (vg estrógenos) juegan un papel importante en el desarrollo de autoinmunidad. Es importante resaltar que gran parte de los resultados reportados en la literatura son de sujetos caucásicos, asiáticos o negros y que para la población mestiza mexicana se reportan estudios en pacientes con artritis reumatoide en donde la edad y el sexo son similares a lo reportado en caucásicos [19,20, 21]. En el caso del género masculino se reporta mayor prevalencia en la dermatomiositis/polimiositis (DM/PM) cuya edad promedio oscila alrededor de los 50 años [22].

Por otro lado, con la caracterización inmunoquímica de los sueros, mediante EIT se esperaba reactividad contra una amplia variedad de antígenos no histonas. Las muestras que dieron patrón moteado grueso mostraron mayor prevalencia de anticuerpos que reconocen SSA-52 (Ro) recombinante, este tipo de antígeno se ha utilizado para aumentar la sensibilidad y la especificidad en la detección del antígeno anti-SSA, en varios estudios en donde detectaron anticuerpos contra el antígeno SSA nativo (60 kDa) también detectamos anticuerpos contra SSA-Ro-52, lo que se confirmó en nuestro estudio, ya que detectamos anticuerpos anti-SSA nativo pero con menor frecuencia, con lo que

confirmamos la reactividad contra el complejo anti-SSA (Ro) de 52kDa en el suero de los pacientes que dieron patrón moteado grueso. El antígeno SSA (Ro) es un complejo ribonucleoproteico pequeño compuesto por tres moléculas proteicas: de 60, 52 kDa y de 47 SSB (La), unidas a fragmentos de ARN (hY1, hY3, hY4, hY5) y localizado en el núcleo o citoplasma de la célula y pertenecen a los antígenos extraíbles del núcleo [23]. Los antígenos SSA (Ro) de 60kDa y SSB (La) de 47 kDa, también fueron reconocidos por los anticuerpos presentes en el patrón moteado grueso con prevalencia menor. El complejo SSA (Ro) de 60kD se encuentra principalmente en el núcleo por lo que se esperaba una mayor presencia de anticuerpos contra esta proteína, sin embargo, cuando se utiliza un antígeno recombinante existe menor reactividad por lo que disminuye la sensibilidad del ensayo. La molécula SSB (La) de 47 kDa es un factor de transcripción de la RNA polimerasa III. Los anticuerpos anti-SSB también dan un patrón moteado grueso por IFI [24].

Otro antígeno reconocido por los anticuerpos que dan el patrón moteado grueso fue el CENP-B recombinante. El antígeno CENP-B es parte del cinetocoro de los cromosomas. Los anticuerpos que reconocen el antígeno CEP-B dan el patrón centrómico [25] por lo que la reactividad observada no fue un evento esperado, sin embargo, se puede explicar ya que es un antígeno recombinante, en el que la secuencia puede estar presente en otras proteínas nucleares. Por lo anterior es importante resaltar que por su reactividad cruzada con otras proteínas nucleares CEN-B recombinante no es un buen antígeno específico. La función de la proteína CENP-B en los centrómeros no es clara, ya que a diferencia de las proteínas CENP-A o CENP-C, el CENP-B no es esencial para la función mitótica.

El CENP-B puede estar presente tanto en centrómeros activos como inactivos, lo que sugiere que no está asociada simplemente a la función centromérica [26].

La caracterización de los sueros que dieron patrón moteado fino, mostraron una alta prevalencia de reactividad contra SSA de 60kDa seguida de alta reactividad contra SSA de 52 kDa recombinante, por lo que se confirma la presencia de anticuerpos contra el complejo SSA (Ro) de 60kDa en este patrón, los cuales se han reportado como característicos en el patrón moteado fino [24]. Otra reactividad observada fue contra el antígeno Ku de 72 y 86 kDa. La molécula Ku (72/86 kDa) pertenece a un complejo formado por DNA y proteínas que reconocen las helicasas.

Los anticuerpos anti-RNP, reconocen las proteínas de 70 kDa, A y C que forman parte de la molécula U1RNA y de U1snRNP [27].

Es importante mencionar que se han descrito más de 20 complejos antigénicos presentes en los ENA por lo que los anticuerpos que dan los patrones moteado fino y grueso y pueden reconocer antígenos aun no caracterizados. Lo anterior se pone de manifiesto por el reconocimiento de proteínas no específicas en las tiras de nitrocelulosa de la EIT. El reconocimiento de las bandas no específicas se puede deber a reactividad cruzada o a la modificación de algunos epítopes conformacionales. La diferencia en las frecuencias de autoanticuerpos que reconocen antígenos inespecíficos en los patrones moteados confirma nuestra hipótesis en el sentido de que están dados por la presencia de anticuerpos contra diferentes antígenos nucleares. Si bien existen epítopes comunes para ambos patrones

existen epítopes propios de cada uno. Dos de los posibles antígenos característicos del patrón son: la molécula SSA (Ro) de 52 kDa recombinante y la molécula PM-Scl (PM-1), esta última se localiza en el nucleolo por lo que su reconocimiento confirma la tinción característica del moteado grueso propuesto por nuestro grupo. Sin embargo, al emplear antígenos recombinantes con la finalidad de aumentar la sensibilidad del ensayo, se pueden tener reacciones cruzadas que sugieren el reconocimiento de otros antígenos.

En el patrón moteado fino la banda que mas reactividad mostró fue la que se localizó entre el antígeno Jo-1 y SSA/SS-B de 52 kDa, ambos antígenos se localizan en el núcleo, y no forman parte de los nucléolos por lo que los sueros que muestran reactividad contra dichos antígenos dan el patrón moteado fino en la IFI cuando se usa como sustrato células HEp-2.

Con base a lo anterior, confirmamos que existen diferencias entre los patrones moteado grueso y fino no solo en función del tamaño de los gránulos en el nucleoplasma, sino también en función del reconocimiento de componentes nucleares. La identificación de los patrones moteado fino y moteado grueso cuando los títulos de los anticuerpos en el suero son altos (>1:640), es una tarea relativamente fácil que no requiere mucho entrenamiento. El problema es en los casos en los que los títulos no son altos (<1:640) en los que se requiere de experiencia para poder definir el patrón.

Como se ha repetido en múltiples ocasiones, el primer paso para la caracterización de la especificidad de los anticuerpos presentes en las muestras séricas de pacientes con enfermedades autoinmunes, es la

identificación de los patrones de IFI, ya que sugieren los posibles epítopes reconocidos y las pruebas posteriores que se deberán hacer.

La identificación adecuada del patrón moteado grueso y fino a títulos positivos (tomando en cuenta los valores de referencia para la población estudiada [10]) llevará al médico especialista a elegir de manera directa la prueba subsecuente, que le dé la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero del paciente, con lo que su diagnóstico será certero y oportuno.

Dentro de la relación que encontramos entre estos patrones y las enfermedades autoinmunes es destacable mencionar que todos los pacientes con diagnóstico de LEG, presentaron patrón moteado fino con una alta frecuencia de reactividad contra SSA (Ro) de 60 y 52 kDa, los cuales son marcadores serológicos que imprimen características diferenciales en ésta enfermedad. Otros antígenos reconocidos fueron: Ku 72/86 kDa. La presencia de estos anticuerpos se ha descrito en el 15 y 20% de los pacientes con LEG y en pacientes con escleroderma, esto concuerda con lo reportado en la literatura [28], ya que en nuestro estudio detectamos a tres pacientes que no solo tenían diagnóstico de LEG, si no también escleroderma y síndrome de Sjögren.

Otras patologías que presentaron los pacientes estudiados mediante IFI y que dieron patrón moteado fino fueron: anemia hemolítica, mielitis longitudinal, hipotiroidismo y hepatitis todas de carácter autoinmune, además del síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y síndrome anti-fosfolípidos. Sin embargo, no en todas estas patologías los AAN sirven para el diagnóstico de la enfermedad, como en el caso del síndrome anti-fosfolípidos, anemia hemolítica autoinmune, mielitis longitudinal autoinmune o

hipotiroidismo autoinmune, en donde existen otros marcadores serológicos que son de mayor valor predictivo para la enfermedad, por lo que existe muy poca información del reconocimiento de algún AAN y su relación con alguna de estas patologías, sin embargo, en algunos casos no se presentaron como único diagnóstico algunos de los pacientes también presentaban LEG, como en el caso del síndrome anti-fosfolípidos, esto puede explicar la presencia de AAN en dichos pacientes.

Para el síndrome de Sjögren se suelen determinar AAN en más del 80% de los casos, en donde los anticuerpos que se asocian a esta patología son los anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B, ambos se consideran marcadores serológicos que forman parte del criterio clasificatorio del S. Sj [29], en nuestro estudio se puede ver que los sueros de estos pacientes mostraron gran reactividad hacia estos antígenos, con base en esto se podría pensar en una relación directa entre la enfermedad y el patrón moteado fino como ayuda en el diagnóstico en pacientes con S. Sj.

En el caso de las enfermedades relacionadas con el patrón moteado grueso, observamos que los pacientes con AR mostraron mayor afinidad hacia este patrón, que en el caso del moteado fino, en estos pacientes se ha reportado que suelen presentar un patrón moteado grueso, sin embargo suele ser inespecífico, ya que se han descrito diferentes subtipos de AAN como anti-histonas, anti-ADN, anti-Ro, anti-La en dicha enfermedad. Otras patologías que mostraron reactividad hacia el patrón moteado grueso, fueron el S. Sj, fenómeno de Raynaud, sin embargo también mostraron reactividad en el

patrón moteado fino, por lo que esto sugiere estudios posteriores de dichas patologías y su relación con estos patrones.

En el caso de las enfermedades no autoinmunes, observamos que la patología con mayor frecuencia fue la cirrosis hepática, esta patología puede tener diferentes causas entre ellas la hepatitis autoinmune y la cirrosis biliar primaria [30] la cual al parecer se considera de tipo autoinmune, esto podría explicar la presencia de AAN en dichos pacientes, para el caso de la hepatitis autoinmune, se han reportados anticuerpos anti-ADN, anti-Ro/SS-A, anti RNP [31], en nuestro estudio, se puede observar que los antígenos que más se reconocieron en los sueros de los pacientes con cirrosis hepática, fueron Ro-52 recombinante, tanto para el patrón moteado fino como en el grueso, al igual que se observó una gran reactividad hacia el antígeno AMA-M2, dicho antígeno se considera como un criterio de diagnóstico en la cirrosis biliar primaria y la hepatitis autoinmune [32], por lo que esto concuerda con lo reportado en la literatura.

8. CONCLUSIONES

- Debido a que la detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia es la prueba de tamizado inicial que ayuda en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes, es importante definir de manera específica las características de los patrones observados.
- La caracterización de los patrones moteado fino y moteado grueso, mediante otra técnica más específica es de gran ayuda para la identificación del antígeno o los antígenos reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunes.
- De acuerdo a los resultados obtenidos demostramos que los patrones moteado fino y moteado grueso tienen diferentes características inmunoquímicas, así como también la relación de estos con las diferentes enfermedades autoinmunes, sobre todo en pacientes con LEG.
- La gran variedad de autoanticuerpos presentes constituye uno de los factores más importantes en el apoyo al diagnóstico de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, la ayuda de un marcador serológico capaz de predecir la presencia o ausencia de ciertas manifestaciones clínicas, sería de gran utilidad en el tratamiento de los pacientes, sobre todo cuando se presentan alteraciones graves. Por esto es necesario seguir

la caracterización de los patrones de inmunofluorescencia ya descritos, así como también la búsqueda de nuevos autoanticuerpos y profundizar en los ya encontrados.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. KAVANAUGH A, TOMAR R, REVELLE J, SOLOMON H. D, MPH, HOMBURGER A.HENRY. 2000. Guidelines for Clinical Use of the Atinuclear Antibody Test and Test for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. Arch Pathol Lab Med 124: 71-81.
2. WIJK AS. 2005. Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. Scand J Rheumatol, 34: 260-268.
3. TUFFANELLI DL., McKEON F, KLEINSMITH DM, BURNHAM TK, KIRSCHNER M. 1983. Anticentromero and anticentriole antibodies in the scleroderma espectrum.. Arch Dermatol 119: 560-566.
4. TAN E.M, FELTKAMP W, SMOLEN J.S, BUTCHER B, DAWKINS, FRITZLER M.J, KOZIOL A.J. 1997. Range of antinuclear antibodies in "Healthy" individuals. Arthritis & Rheumatism 40: 1601-1611.
5. SMOLEN J, STEINER G. 1998. Mixced connective tissue disease. Arthritis Rheum 41: 768-777.
6. PICILLO U, MIGLIARESI MR, FERRUZZI AM, TIRRI G. 1997. Clinical setting of patients with systemic sclerosis by serum autoantibodies. Clin Rheumatol 16: 378-383.
7. FERRI C, BERNINI L, CECCHETTI R. 1991. Cutaneous and serologic subsets of systemic sclerosis. J Rheumatol 18: 1826-1832.
8. ODDIS CV, OKANO Y, RUDERT WA, TRUCCO M, DUQUESNOR RJ, MEDSGER TA Jr. 1992. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. Arthritis rheum 35: 1211-1217.
9. TOZZOLI R. 2002. Guidelines for the laboratory use of autoimmune rheumatic test in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. Am J Clini Path 117: 316-324.
10. ROSAS I, NUÑEZ-ÁLVARES CA, HUERTA MT, ALVARADO A, CAVIEDES J. 2005. Prevalencia de anticuerpos antinucleares (AAN) en donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Rev. Mex Reumatol. 20:72.
11. BioSystems S.A. 2006. Anticuerpos Anti-Nucleares HEp-2 (ANA- HEp-2), Inmunofluorescencia Indirecta en CÉLULAS HEp-2.
12. BINDER SR. 2006. Autoantibody detection using multiplex technologies. Lupus 15: 412-421.

13. IGLESIAS A, MENDEZ P, ROJAS A, ROJAS C, RONDON F, SANCHEZ A, RESTREPO SUAREZ JF. 2002. Historia de los anticuerpos antinucleares. Rev. Col. Reumatol. Vol. 9, 4: 288-311.
14. MURO Y. 2005. Antinuclear antibodies. Autoimmunity 38(1): 3-9.
15. SJÖWALL C, STURM M, CHARLOTTE D, BENGTSSON A, JÖNSEN A, STURFELT G, SKOGH T. 2008. Abnormal antinuclear antibody titer are less common than generally assumed in established case of system lupus erythematosus. The journal of rheumatology 35:10.
16. DELLAVANCE A, LESER GULHERME P, COELHO ANDRADE L. 2007. Relevance of the inmunofluorescence pattern for interpretation of the ANA Test-the case of the dense fine speckled pattern. Rev. Assoc Med Bras 53(5):439-45.
17. DAHLE CH, SKOGH T, ABERG A.K, JALAL A, OLCÉN P. 2004. Methods of choice for diagnostic antinuclear antibody (ANA) screening benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. Journal of Autoimmunity 22: 241-248.
18. KAVANAUGH A, RUSSELL T, REVEILLE J, DANIEL H, SOLOMON, HENRY A, HOMBUEGER. 2000. Guilelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. Arch Pathol Lab Med 124: 71-81.
19. CASTILLO P, ÁLVAREZ AGUILAR C. 2002. La valoración global subjetiva como método de evaluación nutricional en artritis reumatoide. Rev Mex Reumat 17 (2): 117-122.
20. LYNN AH, KWON CK, VENGLIS CM. 1995. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet 57:150-159.
21. LAIVORANTA NS, LUUKKAINEN R, HAKALA M. 2001. Differences between female and male patients with familial rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 60:413-415.
23. SANCHEZ-GUERREROJ, LEW RA, FOSSEL AH, SHUR PH. 1996. Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, and anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of SLE. Arthritis Rheum 39: 1055-1061.
24. BARADA F, ANDREWS BS, DAVIS JS, TAYLOR RP. 1990. Antibodies to Sm in patients with in SLE. Lupus 4: 86-94.
25. TAN EM. 1982. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. Adv Immunol 33: 167-240.

26. SHUELER MG, SULLIVAN BA. 2006. Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu. Rev. Genom* 7: 301-313.
27. MIGLIORINI P, BALDINI C, ROCCHI V, BOMBARDIERE S. 2005. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity* 38(1): 47-54.
28. SAWALH AH, HARLEY JB. 2004. Antinuclear autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 16: 534-40.
29. VITALI C, BOMBARDIERI S, MOUTSOPOLOUS HM. 1993. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 36: 340-347.
30. BERENGUER J, BRUGUERA M, GARCÍA BENGOCHEA M. 2001. Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares. *Elba SA* 169-173.
31. WORMAN HJ, COURVALIN JC. 2003. Antinuclear antibodies specific for primary biliar cirrhosis. *Autoimmun Rev.* 2(4): 211-7.
32. ZACHOU K, RIGOPOULOU E, DALEKOS GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis* 1:2.