

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**



**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES
POR INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA QUE
ORIENTEN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES
AUTOINMUNES EN PACIENTES QUE CONSULTAN EL
SERVICIO DE REUMATOLOGÍA DEL HOSPITAL
NACIONAL ROSALES EN EL PERÍODO DE MARZO A
JUNIO DE 2010**

PRESENTADO POR:

Miriam Azucena Quintanilla López
Olinda Patricia Bonilla
Miriam Guadalupe Moreira Penado

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE:
LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO**

DOCENTE DIRECTOR:

Licenciada Lorena Patricia Pacheco Herrera

San Miguel, El Salvador, Centro América, 2010.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES**

**MÁSTER RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ
RECTOR**

**MÁSTER MIGUEL ÁNGEL PÉREZ RAMOS
VICERRECTOR ACADÉMICO**

**MÁSTER OSCAR NOÉ NAVARRETE
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

**LICENCIADO DOUGLAS BLADIMIR CHÁVEZ
SECRETARIO GENERAL**

**DOCTOR RENÉ MADECADEL PERLA JIMÉNEZ
FISCAL GENERAL**

**FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
AUTORIDADES**

**DOCTORA ANA JUDITH GUATEMALA DE CASTRO
DECANA EN FUNCIONES**

**DOCTORA ANA JUDITH GUATEMALA DE CASTRO
VICEDECANA**

**INGENIERO JORGE ALBERTO RUGAMAS RAMÍREZ
SECRETARIO DE LA FACULTAD**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
AUTORIDADES**

**DOCTORA OLIVIA ANA LISSETH SEGOVIA VELÁSQUEZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**LICENCIADA KAREN RUTH AYALA REYES
COORDINADORA DE LA CARRERA DE LABORATORIO
CLÍNICO**

**MÁSTER ELBA MARGARITA BERRÍOS CASTILLO
COORDINADORA GENERAL DEL PROCESO DE
GRADUACIÓN**

ASESORES:

**LICENCIADA LORENA PATRICIA PACHECO HERRERA.
DOCENTE DIRECTOR.**

**LICENCIADA KARLA MARIA MÉJIA ORTIZ.
ASESORA DE ESTADISTICA.**

**MÁSTER ELBA MARGARITA BERRÍOS CASTILLO.
ASESORA DE METODOLOGÍA.**

AGRADECIMIENTOS GENERALES

El desarrollo de esta investigación fue posible gracias al apoyo de muchas personas que incondicionalmente estuvieron brindándonos su ayuda, de las cuales además recibimos consejos para nuestra formación profesional. Con mucho cariño agradecemos a:

1. Dios Todopoderoso.
2. Universidad De El Salvador (FMO).
3. Laboratorio Clínico el Hospital Nacional Rosales de San Salvador.
4. Población Objeto de Estudio.
5. Dr. Mauricio Ventura Centeno (Director del Hospital Nacional Rosales de San Salvador).
6. Licenciada Claudia Marina Jovel Membreño (Jefe del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Rosales de San Salvador).
7. Licenciado Gilberto Antonio Nolasco Portillo (Responsable del Área).
8. Licenciada Lorena Patricia Pacheco Herrera (Docente Director).
9. Máster Elba Margarita Berrios Castillo (Asesora de Metodología).
10. Licenciada Karla María Mejía Ortiz (Asesora Estadística).
11. Licenciada Karen Ruth Ayala Reyes (Coordinadora de la Carrera de Laboratorio Clínico).
12. A nuestro amigo Julio Adonay Osorio Chávez (“Julito”) por toda su colaboración y disponibilidad en todo momento a nuestra investigación.

Miriam Q. / Patricia B. / Miriam M.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todo Poderoso:

Por brindarme la vida y guiarme por el camino correcto para poder alcanzar este triunfo

A Mi Madre María Olinda Bonilla Y A Mi Abuela Delfina Bonilla:

Por darme la estabilidad emocional, económica, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin su apoyo.

A Mi Amiga Fanny Esmeralda Gomes Flores:

Por demostrarme su apoyo incondicional durante toda esta etapa de mi vida.

A Mi Hermana Alma Arely:

Por sus muestras de cariño y apoyo durante toda mi vida.

Mis Tíos:

Por el apoyo emocional y económico brindado

A Mis Primos:

En especial a Telma, Noé, Maritza, Fátima Y Merlín que de una u otra forma contribuyeron para alcanzar este triunfo.

A Mi Equipo De Tesis Miriam y Azucena:

Por su comprensión y apoyo durante la realización de esta investigación

A Mis Asesoras De Tesis:

Lorena Pacheco, Karla Mejía Y Margarita Berrios por todos los conocimientos y consejos brindados, pues gracias a ello he alcanzado un triunfo más en mi vida.

Patricia Bonilla

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todo Poderoso y a la Virgen María:

Por permitirme la vida, guiar mis pasos y brindarme la sabiduría y fortaleza necesaria para superar los obstáculos que pudiésemos encontrar.

A mis Padres:

Miriam Isabel y Juan Bautista por su amor, oraciones y apoyo incondicional.

A mi tia Margarita:

Por su cariño y apoyo en la culminación de mi carrera.

A mis tios:

Gloria, René, Luisa, Ricardo, Antonio, Celia, Francisco y Lidia por su cariño incondicional.

A mis Primos:

Especialmente mis corazones Alejandra y Dinora, por confiar siempre en mí y brindarme su apoyo.

A mis Amigas:

Cristina, Ligia, Abilia, Elida, Isabel, Rosa y Carolina por su amistad.

A mis compañeras de Tesis:

Mis Amigas Azucena y Paty Por su paciencia, apoyo y comprensión en los momentos difíciles de la investigación.

A mis Docentes:

Por sus conocimientos académicos.

Miriam Guadalupe.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios Todopoderoso:

Por ayudarme para alcanzar la meta propuesta y por sus bendiciones a lo largo de nuestra carrera.

A mis Padres Ramón y Ana Miriam:

A mi padre por sus oraciones, paciencia y comprensión en los momentos difíciles en mi formación como persona y como profesional.

A mi madre quien fue mi inspiración para seguir adelante y por transmitirme el ánimo para culminar mi carrera.

A mis Hermanos:

Josué, Moisés y Ramón por su apoyo incondicional durante toda la trayectoria de mi carrera.

A mis Amigos:

Adonay, Paola, Gilberto motivarme a lo largo de toda mi formación como persona y como profesional.

A mis Compañeras De Tesis:

Miriam y Patricia por la perseverancia, entusiasmo y amistad para obtener el triunfo académico.

A mis Docentes:

Por su orientación y colaboración en la realización de la investigación.

Miriam Azucena.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁG.
RESUMEN.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	xvii
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
1.1 Antecedentes de la Problemática en Investigación.....	21
1.2 Enunciado del Problema.....	25
1.3 Objetivos de la Investigación.....	26
1.3.1 Objetivo General.....	26
1.3.2 Objetivos Específicos.....	26
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO.....	28
2.1 Sistema Inmunitario.....	28
2.2 Generalidades de la Respuesta Inmune.....	29
2.3 Enfermedades Autoinmunes.....	31
2.3.1 Factores Etiopatogénicos.....	33
2.3.2 Factores Genéticos.....	33
2.3.3 Factores Ambientales.....	35
2.3.4 Criterios y Síntomas de las Enfermedades Autoinmunes.....	36
2.3.5 Clasificación de Enfermedades Autoinmunes.....	38
2.3.6 Enfermedades Autoinmunes Comúnmente Diagnosticadas en El Salvador.....	39

CONTENIDO

2.4 Epidemiología.....	47
2.5 Diagnóstico de Laboratorio.....	48
2.5.1 Inmunofluorescencia.....	49
2.6 Anticuerpos Antinucleares.....	50
2.6.1 Historia de Anticuerpos Antinucleares.....	52
2.6.2 Significado Inmunológico de los Diferentes Patrones de Inmunofluorescencia.....	54
2.6.3 Relación de los Patrones de Inmunofluorescencia con Enfermedades Autoinmunes.....	57
2.7 Pruebas Especiales.....	58
2.7.1 Anticuerpos Anti-ADN.....	58
2.7.2 Anticuerpos Anti- Histonas.....	58
2.7.3 Anticuerpos Anti-Sm y RNP.....	59
2.7.4 Anticuerpos a SS-A/Ro y SS-B/La.....	60
2.8 Definición de Términos Básicos.....	61
CAPÍTULO III SISTEMA DE HIPÓTESIS.....	66
3.1 Hipótesis de Investigación.....	66
3.2 Hipótesis Nula.....	66
3.4 Operacionalización de las Hipótesis.....	67
CAPÍTULO IV DISEÑO METODOLÓGICO.....	69
4.1 Tipo de Investigación.....	69
4.2 Población.....	69
4.3 Muestra.....	70
4.4 Tipo de Muestreo.....	71
4.5 Técnica de Obtención de Datos.....	71
4.6 Técnicas de Laboratorio.....	71

CONTENIDO	PAG.
4.7 Equipo, Material y Reactivo.....	72
4.8 Procedimiento.....	73
CAPÍTULO V PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	81
5.1 Tabulación, Análisis e Interpretación de los Datos.....	81
5.2 Prueba de Hipótesis.....	94
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	100
6.1 Conclusiones.....	100
6.2 Recomendaciones.....	101
ANEXOS.....	104
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE CUADROS

CONTENIDO	PAG.
Cuadro 1. Indicación por Género de Prueba de ANA realizadas.....	76
Cuadro 2. Resultados Obtenidos de la Prueba de ANA Realizadas.....	78
Cuadro 3. Resultados Positivos Obtenidos por Géneros de la Prueba.....	80
Cuadro 4. Patrones Observados al Microscopio de fluorescencia.....	82
Cuadro 5. Patrones Observados al Microscopio de Fluorescencia por Género.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

CONTENIDO	PAG.
Gráfico 1. Porcentajes de Indicación por Género de Pruebas de ANA.....	77
Gráfico 2. Porcentajes de Resultados Obtenidos de la Prueba de ANA.....	79
Gráfico 3. Porcentajes de Resultados Obtenidos por Género.....	81
Gráfico 4. Porcentajes de Patrones Observados al Microscopio.....	84
Gráfico 5. Patrones Observados al Microscopio por Género.....	87

LISTA DE ANEXOS

CONTENIDO	PAG.
Anexo 1. Cronograma de Actividades Generales.....	98
Anexo 2. Cronograma de Actividades Específicos.....	99
Anexo 3. Sistema Inmune.....	100
Anexo 4. Lupus Eritematoso Sistémico.....	101
Anexo 5. Artritis Reumatoide.....	102
Anexo 6. Síndrome Sjögren.....	103
Anexo 7. Esclerosis Sistémica.....	104
Anexo 8. Diabetes Mellitus Tipo I.....	105
Anexo 9. Inmunofluorescencia.....	106
Anexo 10. Toma de Muestras Para IFI.....	107
Anexo 11. Procedimiento De Inmunofluorescencia Indirecta.....	108
Anexo 12. Patrones de Tinción Observados.....	113

Resumen

La presente investigación fue realizada en el Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador y la prueba se ejecutó en el Laboratorio Clínico del mismo, empleando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en líneas celulares Hep-2 el **objetivo** de la investigación fue identificar los Anticuerpos antinucleares que pueden estar presentes en el suero de los pacientes. El estudio se ejecutó en los meses de marzo a junio de 2010, el proceso inicio con la toma de las muestras de los 150 pacientes, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión para poder realizarles la prueba. En base a lo anterior logramos alcanzar nuestros objetivos propuestos al inicio de nuestra investigación los cuales están toma y procesamiento de las muestras a analizar, determinación de los anticuerpos antinucleares y con los datos obtenidos poder orientar el diagnostico de las enfermedades autoinmunes. **Metodología:** dicha investigación es de tipo prospectivo, transversal y de laboratorio y para que se llevara a cabo la investigación se tomaron en cuenta los siguientes criterios: pacientes que visiten el servicio de reumatología, con sintomatología sugestiva a enfermedad autoinmune. **Resultados obtenidos:** Se muestra que de los 150 pacientes que se les sospecho una enfermedad autoinmune 49 de ellas presentaron los anticuerpos, luego se procedió a realizar una comparación entre los géneros de los pacientes siendo género femenino el que presento mayor predominio de pruebas positivas, confirmando que en las mujeres hay una alta sospecha de enfermedades autoinmunes. Al final se obtuvo un 32.7% de positividad a la presencia de anticuerpos antinucleares en las muestras analizadas frente un 67.3 % de muestras negativas.

Palabras claves: Sistema Inmune, Autoanticuerpos, Respuesta Inmune, Inmunofluorescencia Indirecta, Anticuerpos Antinucleares, Enfermedades Autoinmunes, Patrone

Introducción

Los autoanticuerpos son anticuerpos dirigidos contra antígenos del propio organismo; muchas veces son hallazgos serológicos en pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas, de los anticuerpos identificados hasta ahora sólo algunos tienen importancia en el diagnóstico de las enfermedades reumáticas y pueden considerarse como marcadores serológicos; otros son característicos de una enfermedad determinada pero no son específicos.

Muchas de las Enfermedades Autoinmunes son raras; sin embargo, como grupo afectan a millones de personas, la mayoría de ellas afectan más a las mujeres y en particular a las mujeres en edad laboral y durante sus años fértiles; aunque algunas aparecen más frecuentemente en determinados grupos étnicos, lo cierto es que su impacto social, económico y sanitario se extiende además de la familia, a la organización laboral, al entorno social y a los amigos y compañeros de trabajo.

Las Enfermedades Autoinmunes no son contagiosas ni se pueden adquirir, no se transmiten a otras personas como las infecciones ó como el SIDA; tampoco son un tipo de cáncer, los genes que hereda una persona contribuyen a su susceptibilidad para desarrollar esta patología; además, los miembros individuales de una familia con enfermedades autoinmunes pueden heredar y compartir un conjunto de genes anormales. El diagnóstico de estas enfermedades se basa en los síntomas del individuo, los hallazgos de la exploración física y los resultados de las pruebas de laboratorio.

Las Enfermedades Autoinmunes pueden ser difíciles de diagnosticar, especialmente al principio de la evolución de la enfermedad, las pruebas analíticas de Anticuerpos Antinucleares corresponden a una prueba de sangre que examina los anticuerpos antinucleares (ANA), los cuales son sustancias producidas por el sistema inmunitario que atacan los propios tejidos del cuerpo.

La detección de Anticuerpos antinucleares (ANA) juega un importante papel en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, la Inmunofluorescencia (IFI) se considera como un screening de ANA; Por lo que nos llevó a plantearnos una temática de investigación la cual se desarrolló en el Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador en pacientes con cuadro clínico sugerente a una Enfermedad Autoinmune una de las principales causas de consulta en dicha área en los últimos años en este nosocomio.

En la presente investigación se pretende ayudar a mejorar y agilizar la toma de decisiones en el diagnóstico de dichas patologías, creando conciencia al personal de laboratorio y al clínico sobre la importancia de su participación en el desarrollo de la prueba para determinar la presencia de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta que orientan el diagnóstico de Enfermedades Autoinmunes, su emisión e interpretación de resultados y con esto impulsar un precedente del continuo apoyo de parte de las autoridades pertinentes a suplir la necesidad que requiere la realización de dicha prueba así como también ampliar conocimientos teóricos y prácticos a todos aquellos interesados en esta área.

Para ello se inicia con el Capítulo I detallando datos sobresalientes que a lo largo de la historia han establecido relaciones entre la presencia anticuerpos antinucleares y las enfermedades autoinmunes, lo que induce a crearnos ciertos cuestionamientos con el objeto de darles repuesta durante el desarrollo de nuestra investigación.

A continuación se detalla un objetivo general el cual orienta el desarrollo de la investigación convirtiéndose en el punto de partida del estudio y cuatro objetivos específicos donde se enuncian los logros a alcanzar durante el proceso investigativo.

Seguidamente en el Capítulo II, se incluye un fundamento teórico que avala la importancia de esta temática a lo largo de la historia iniciando con la definición de sistema inmune y enfermedades autoinmunes mencionando sus generalidades y seguido de la

Descripción del diagnóstico de laboratorio que se utilizó para la determinación de la presencia de anticuerpos antinucleares en el suero de pacientes en estudio y demás información que permita enriquecer los conocimientos del lector.

El Capítulo III plantea el sistema de hipótesis para la enfermedad autoinmune, incluyendo la definición conceptual y operacional de las variables; posteriormente se detalla el diseño metodológico que demuestra la logística que se siguió durante el estudio, el tipo de investigación, los métodos y procedimientos, así como los materiales, equipo y reactivos que se utilizaron, también se define la planeación y organización de las actividades hasta el momento de la ejecución.

En el Capítulo IV se explica el diseño metodológico empleado, el cual dirige y orienta la forma en que se desarrolló el estudio, el tipo de investigación, los métodos y procedimientos que se siguieron, así como el material, equipo y reactivos que se utilizaron. También se define la planeación y organización de las actividades hasta el momento de la ejecución.

Posteriormente en el Capítulo V se expone la tabulación, análisis e interpretación de los datos a través de cuadros y gráficos para mayor comprensión de los resultados obtenidos durante el proceso de nuestra investigación.

En el Capítulo VI adjuntamos una serie de conclusiones y recomendaciones a las que como grupo investigador hemos llegado.

Por último se presentan los anexos y referencias bibliográficas utilizadas que constituyen la fundamentación teórica y visual de la presente investigación.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.1 Antecedentes de la Problemática en Investigación.

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

Paul Ehrlich a inicios del siglo XX denominó *Horror autotoxicus* a la propiedad del sistema inmune en individuos normales de prevenir el desarrollo de autoinmunidad, la cual se pensaba que era patológica, ahora sabemos que no es necesariamente patológica ni ocasional, ya que los fenómenos autoinmunes pueden presentarse en sujetos normales o pueden acompañar a algunas enfermedades infecciosas y sólo bajo ciertas circunstancias evolucionarán a enfermedad, encontrando que la autoinmunidad en individuos sanos aumenta con frecuencia al avanzar la edad.

Estos últimos estudios sugieren que a finales del siglo XIX e inicios del siglo XX la Inmunología tuvo un auge importante, pues en ellos y durante este período empezó a utilizarse un nuevo glosario, con términos tales como: antígeno, anticuerpos, aglutininas, precipitinas, sensibilización y opsonización; Así como también se dió el surgimiento de nuevas técnicas entre estas la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) es la que más se utiliza y fue implementada por TH Weller y AH. Coons en 1954.

Para la realización de la prueba el tejido que se va a utilizar es tratado con el suero del paciente al que se le une un suero con una anti inmunoglobulina marcada con fluoresceína, este tejido en esa época se exponía a una cámara húmeda por un tiempo adecuado para prevenir la evaporación y posteriormente se le unía el anticuerpo.

Este método es más seguro, más versátil, fácil de controlar y el conjugado que se utiliza es una globulina antihumana que se puede utilizar con el suero de muchos pacientes.

En 1957 en la Universidad de Yale, Friou describe la técnica para demostrar los anticuerpos en forma semicuantitativa a través de la microscopía por Inmunofluorescencia Indirecta; artículos de este investigador publicados en diferentes revistas en 1958 permitieron estandarizar el uso de la IFI para demostrar que en el suero de los pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), existían inmunoglobulinas que se unían al núcleo de las células de los tejidos. Este método sirvió de patrón de oro para la búsqueda de anticuerpos en las Enfermedades Autoinmunes (EIA) y como patrón comparativo de otras tecnologías.

Un año antes Robbins, Holman, Deicher y Kunkel describieron los anticuerpos anti-DNA, otro avance importante en el conocimiento del lupus; este grupo fue crucial en el avance del conocimiento relacionado con la estructura de los anticuerpos, la patogénesis del lupus y la implementación de las técnicas para el diagnóstico; fueron los años de 1957 a 1960 importantes para la investigación ya que en varios laboratorios utilizando la misma técnica se corroboraron los hallazgos anteriores.

Estos estudios además empezaron a plantear la acción de los anticuerpos a nivel del tejido renal, especialmente en la génesis de la glomerulonefritis, la acción a nivel de los núcleos celulares, la prevalencia de los anticuerpos, los efectos sobre los leucocitos y los primeros estudios de titulación. Así, a finales de la década de 1950 e inicio de la década de 1960 se implementan las técnicas de IFI, se establece que los anticuerpos y que el complejo núcleo – histonas constituye un grupo de importantes antígenos nucleares.

Con el descubrimiento de la inmunofluorescencia se logró otro avance en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes y se inicia el esclarecimiento de la asociación de los diferentes anticuerpos antinucleares con las diferentes enfermedades, es decir, se empezó a entender el concepto de autoinmunidad y de enfermedad autoinmune.

A finales de los años 1950 varios grupos de Europa y Estados Unidos habían dilucidado parcialmente la base inmunoquímica del fenómeno LES y ANA esto documentaba la importancia de la actividad de los Anticuerpos Antinucleares circulantes y su interacción con los antígenos blanco del núcleo como el ADN y la desoxirribonucleoproteína.

El profesor Beck en conjunción con Neville R. Rowel describen el paso trasplacentario de los ANA en la revista “Lancet” en 1963. Ya establecida la técnica de la Inmunofluorescencia se empezaron a observar diferentes patrones de tinción del núcleo con el suero de los pacientes, utilizando para ello una técnica bien estandarizada, con sustrato de hígado de ratón.

Este investigador publicó artículos en las revistas más importantes de la medicina y de la inmunología de la década de 1960 estableciendo así las bases de los diferentes patrones nucleares de la IFI en el LES, los cuales pueden estar en forma aislada ó en combinación. Dos meses después de la publicación de Beck; Lachmann y Kunkel confirmaron el mismo hallazgo, especialmente el patrón homogéneo y el moteado; Fennell, Rodnan y Vásquez también confirmaron el patrón moteado; igual observación realizaron Bardawil y sus colaboradores.

Alrededor de un 5% de la población mundial tiene alguna patología autoinmune, de las cuales sólo un 1% es reumatológico.¹ En las últimas cuatro décadas, la lista de enfermedades asociadas autoanticuerpos ha crecido de forma importante, sumándose a la lista la autoinmunidad secundaria a neoplasias y paraneoplasias, estas enfermedades afectan tanto a los países desarrollados como a los que están en vías de desarrollo o al tercer mundo, las diferencias en los casos descritos dependen más de las posibilidades económicas u organizativas para diagnosticar y comunicar en la literatura médica la prevalencia real de los enfermos.

Las EIA constituyen uno de los problemas más importantes de la medicina actual; aunque por separado muchas de estas enfermedades son poco frecuentes, algunas estimaciones indican que más del 20% de la población sufre alguna de ellas. En nuestro país han sufrido un incremento en los últimos años, siendo estas uno de los motivos de consulta mas frecuentes en los servicios de salud a nivel nacional.²

¹ Antonio Iglesias Gamarra & Cols. Revista Colombiana De Reumatología
Revista Colombiana De Reumatología
VOL. 9 No. 4, Diciembre 2002, pp. 288-311
© 2002, Asociación Colombiana de Reumatología

² Datos proporcionados por departamento Estadístico Hospital Nacional Rosales de San Salvador

Algunas de ellas aparecen mas frecuentes en determinados grupos étnicos; lo cierto es que su impacto social, económico y sanitario se extiende además a la familia, la organización laboral y a su entorno social debido al alto costo que genera tanto para los pacientes como para la red de salud publica y privada por tal motivo los ANA no están contemplados en el perfil de rutina de los laboratorios lo que conlleva a una estricta selección de los pacientes a los cuales se les hace necesario realizar este análisis.

Es importante mencionar que los resultados de esta prueba son sensibles pero no específicos para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune determinada ya que sólo sirven como una orientación para agilizar la pronta toma de decisiones por parte del clínico, de esta resultan útiles para establecer un diagnóstico preliminar de la patología en sospecha.

En el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador a diario son atendidos una gran cantidad de pacientes sólo en el año anterior fueron atendidos 5,069 pacientes de los cuales aproximadamente un 45% se les indicó la prueba de ANA de estos a un 32% se les realizó el 13% restante no fue procesada a causa de falta de disponibilidad de reactivo utilizado esto por ausencia de suministros en el área de pruebas especiales encargada de la ejecución de la misma en el laboratorio³.

Esta falta de apoyo por parte de las autoridades es causada por el desconocimiento y la falta conciencia de la importancia de contar con los requerimientos necesarios para la realización de esta prueba por lo que consideramos necesario hacer ver la necesidad de darle mayor proyección dentro y fuera del nosocomio así como también a todo el personal involucrado en esta área.

³ Ídem nota anterior.

1.2 Enunciado del Problema.

De la problemática descrita se deriva el problema el cual es objeto de estudio y se enuncia a través de las siguientes interrogantes:

- ¿La Determinación de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta orienta el diagnóstico de enfermedades autoinmunes en pacientes que consultan el Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales?

Así también surgen otras interrogantes:

- ¿Cuál es la frecuencia de enfermedades autoinmunes según el sexo en los pacientes que consultan el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales durante la investigación?
- ¿Qué relación tiene la presencia de anticuerpos antinucleares con el sexo de los pacientes que consultan el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales?
- ¿Cuáles son los patrones más frecuentes encontrados a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en los pacientes que consultan el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales?

1.3 Objetivos de la Investigación.

1.3.1 Objetivo General.

Determinar la presencia de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta que orienten al diagnóstico de Enfermedades Autoinmunes en pacientes que consultan el servicio de Reumatología Del Hospital Nacional Rosales en el período de marzo a junio de 2010.

1.3.2 Objetivos Específicos.

1. Realizar toma y procesamiento de muestra a los pacientes que presenten cuadro clínico sugestivo de Enfermedades Autoinmunes.
2. Determinar por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta la presencia de Anticuerpos Antinucleares.
3. Identificar patrones de Anticuerpos Antinucleares más frecuentes encontrados por Inmunofluorescencia Indirecta.
4. Relacionar los resultados de los patrones de Anticuerpos Antinucleares encontrados con el sexo de los pacientes que resultaron positivos a la prueba.
5. Proporcionar apoyo al clínico mediante la emisión de los resultados para generar un diagnóstico oportuno y eficiente de las Enfermedades Autoinmunes y agilizar un tratamiento adecuado para el paciente.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Sistema Inmunitario.

Es definido como el conjunto de estructuras y procesos biológicos en el interior de un organismo que le protege contra enfermedades identificando y matando células patógenas y cancerosas. Detecta una amplia variedad de agentes, desde virus hasta parásitos intestinales y necesita distinguirlos de las propias células y tejidos sanos del organismo para funcionar correctamente.

El sistema inmunitario se encuentra compuesto por linfocitos, leucocitos, anticuerpos, células T, citoquinas, macrófagos, neutrófilos, entre otros componentes que ayudan a su funcionamiento. La detección es complicada ya que los patógenos pueden evolucionar rápidamente, produciendo adaptaciones que evitan el sistema inmunitario y permiten a los patógenos infectar con éxito a sus huéspedes. (Ver Anexo N° 3)

Para superar este desafío, se desarrollan múltiples mecanismos que reconocen y neutralizan patógenos, incluso los sencillos organismos unicelulares poseen sistemas enzimáticos que los protegen contra infecciones virales.

Otros mecanismos inmunológicos básicos se desarrollaron en antiguos eucariontes y permanecen en sus descendientes modernos como las plantas, los peces, los reptiles y los insectos. Entre estos mecanismos figuran péptidos antimicrobianos llamados defensinas, la fagocitosis y el sistema del complemento.

Tanto los vertebrados como los humanos tienen mecanismos de defensa aún más sofisticado. Los sistemas inmunológicos de los vertebrados constan de muchos tipos de proteínas, células, órganos y tejidos, los cuales se relacionan en una red elaborada y dinámica; como parte de esta respuesta inmunológica más compleja el sistema inmunitario humano se adapta con el tiempo para reconocer patógenos específicos más eficientemente.

A este proceso de adaptación se le llama "inmunidad adaptativa" o "**inmunidad adquirida**" capaz de poder crear una memoria inmunológica, esta creada desde una respuesta primaria a un patógeno específico proporciona una respuesta mejorada a encuentros secundarios con ese mismo.

El sistema inmune constituye un sistema de protección del organismo frente a gérmenes y otras sustancias extrañas. Está constituido por dos partes principales, en una de ellas intervienen los linfocitos B, que son células que producen anticuerpos, proteínas que reconocen a las sustancias extrañas, facilitando así su eliminación del organismo; a veces se le conoce como inmunidad humoral.

La otra parte fundamental del sistema inmune está representada por otro tipo de células de la serie blanca de la sangre, también especiales, llamadas linfocitos T. Estos linfocitos pueden atacar directamente a las sustancias extrañas; a veces se habla de sistema inmune celular, es necesario cierto tiempo para que se alcance una maduración completa de estas partes del sistema inmune.

Los linfocitos T pasan a ser protectores y se forman anticuerpos cuando la persona ya ha estado expuesta a amenazas específicas reconocidas como extrañas. El sistema inmune elabora a lo largo de la vida una "biblioteca" de sustancias identificadas y de microorganismos, clasificándolos como amenazantes o no.

2.2 Generalidades de la Respuesta Inmune.

Varias de las células del sistema inmune y de las moléculas producidas por ellas, mantienen una permanente vigilancia para detectar lo extraño, atacarlo, tratar de destruirlo por medio de un conjunto de mecanismos conocidos como inmunidad innata o natural que es específica, es decir, se ejerce contra todos los microorganismos patógenos.

Si no logra controlar al agresor inicia una serie de procesos adicionales conocidos como inmunidad adquirida por medio de los cuales produce anticuerpos, inmunidad humoral, o células con capacidad de destruir un agente patógeno específico aisladamente o con la célula

dentro de la cual se ha ocultado, proceso que se conoce como inmunidad celular. El proceso de inmunidad adquirida le permite guardar memoria del encuentro con el microorganismo agresor.

Forman parte de la inmunidad innata: factores genéticos, barreras naturales, fagocitosis, sistema del complemento, inflamación, células asesinas naturales; mientras que la inmunidad adquirida está formada por: los linfocitos T que se originan en la médula ósea y maduran en el timo produciendo células citotóxicas y moléculas estimuladoras conocidas como citoquinas; linfocitos B originados en el hígado embrionario y en la médula ósea y producen anticuerpos.

Inmunidad Activa:

Es aquella que se desarrolla en el curso de una enfermedad infecciosa, durante el proceso del control de la infección varias células integrantes del sistema específico de la inmunidad aprende procesos metabólicos que les permiten ante ulteriores ataques por el mismo germen, evitar que se presente la enfermedad, bien sea por la producción de anticuerpos o por la acción de las células que actúan directamente contra el agente agresor.

Este tipo de inmunidad explica la resistencia que se adquiere contra ciertas enfermedades infecciosas, especialmente algunas producidas por virus, que una vez sufrida no se vuelven a presentar durante la vida del individuo.

Inmunidad Pasiva:

Es el proceso de defensa que se logra contra determinado agente patógeno mediante el empleo de anticuerpos protectores que provienen del exterior. De esta forma es posible controlar una infección sin que el sistema inmune del individuo haya tenido contacto previamente con el agente patógeno.

Este mecanismo explica también la defensa que contra las infecciones tiene el recién nacido gracias a los anticuerpos que recibe de la madre a través de la placenta, en el calostro y en la leche. En la práctica clínica se puede administrar a la persona que sufre una enfermedad infecciosa concentraciones de anticuerpos específicos contra el microorganismo responsable de la enfermedad de esta forma se logra controlar rápidamente la infección.

Este procedimiento se utiliza también para prevenir el desarrollo de ciertas infecciones en pacientes con mecanismos inmunológicos deficientes y que se han puesto en contacto con un agente infeccioso.

También se puede evitar el desarrollo de la manifestación clínica de varias enfermedades infecciosas, si durante el período de incubación se suministran anticuerpos específicos contra los germen responsables.

2.3 Enfermedades Autoinmunes.

El sistema inmune (SI) tiene como funciones primordiales la defensa del organismo, a través del reconocimiento de antígenos potencialmente patógenos y su eliminación mediante dos mecanismos efectores: la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Sin embargo, éstos pueden fallar por una inadecuada respuesta a patógenos (inmunodeficiencia), por falta de reconocimiento a lo propio (autoinmunidad) o por una respuesta exagerada e inapropiada a un antígeno (hipersensibilidad) por tanto, el reconocimiento de lo propio y lo no propio por el sistema inmune es de vital importancia para el entendimiento de la autoinmunidad.

Para prevenir la autoagresión, el sistema inmune cuenta con mecanismos que le permiten identificar a los antígenos derivados de la misma (alogénicos) o de otras especies (xenogénicos) y puede distinguirlos de los propios (singénicos).

Existen tres mecanismos que explican la tolerancia y el reconocimiento de los antígenos propios, éstos son: la delección clonal, la anergia clonal y la mutación somática. Al fallar estos mecanismos, en especial si el antígeno semeja a los componentes propios del organismo, la respuesta inmune podría resultar en enfermedad autoinmune.

Los criterios para clasificar las enfermedades autoinmunes fueron propuestos desde 1962 por Milgron y Witbesky; de acuerdo a estos criterios las enfermedades autoinmunes definidas son: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Enfermedad de Graves, Miastenia Gravis, Pénfigo Vulgar, Anémia Hemolítica Autoinmune, Púrpura Trombocitopénica Idiopática, oftalmía simpática y Enfermedad de Goodpasture.

Otras enfermedades que cursan con fenómenos autoinmunes son: la Artritis Reumatoide, el Síndrome de Sjögren primario, la Esclerosis Múltiple, Diabetes Mellitus Insulino Dependiente, Hepatitis Crónica Activa y la Cirrosis Biliar Primaria. Mientras que las enfermedades asociadas a autoinmunidad son: la Tiroidítis de Hashimoto, Fiebre Reumática, Anémia Perniciosa, Esclerosis Sistémica y la Polimiositis; en la patogenia de las enfermedades autoinmunes se han implicado estímulos ambientales, que inducen una respuesta inmune anormal.

El diagnóstico de estas enfermedades se establece con bases clínicas sin embargo, a menudo el médico se enfrenta a pacientes cuyos signos y síntomas son comunes a varias enfermedades reumáticas y en estos casos la detección de anticuerpos antinucleares es de gran utilidad como orientadores del diagnóstico y para evaluar la efectividad del tratamiento.

La palabra “auto” proviene del griego y quiere decir uno mismo, el sistema inmune es una compleja red de células y componentes celulares llamados moléculas, que normalmente trabajan para defender al organismo y eliminar infecciones causadas por bacterias, virus y otros microorganismos invasores⁴. En una persona con una enfermedad autoinmune, su sistema inmunitario ataca erróneamente a células, tejidos y órganos de su propio organismo.

Las enfermedades autoinmunes son aquellas en las que nuestras defensas o sistema inmunológico funcionan de un modo anormal reaccionando frente a algunas células de nuestro cuerpo como si fueran "enemigos" y por tanto dañándolas. Este desajuste puede afectar solo a un tejido, a un órgano o a varios y acaban incluso produciendo cambios en los tejidos; cada vez nuestro sistema inmune verá esta zona más como un cuerpo extraño.

⁴ [http:// www.espondilitis.eu/Enfermedades_Autoinmunes.html](http://www.espondilitis.eu/Enfermedades_Autoinmunes.html)

Es un caso parecido a las alergias en donde el cuerpo reacciona de un modo desproporcionado frente a sustancias que en si no son ningún peligro para nuestra salud, los órganos y tejidos más afectados son: la piel, los músculos, las articulaciones, los glóbulos rojos y otros componentes de la sangre y algunas glándulas como el páncreas o la tiroides.

Aunque no hay unanimidad al respecto algunas teorías afirman que, junto a una predisposición genética, el efecto de algunos microorganismos (virus, bacterias, etc.) y/o el de algunos medicamentos, las dietas muy desequilibradas y llenas de aditivos también podrían "colaborar", en muchos casos, probablemente sea un conjunto de varios factores; es necesario que se continúe investigando ya que cada vez hay más personas con enfermedades autoinmunes y hay que tener en cuenta que la mayoría son enfermedades que empeoran mucho la calidad de vida.

2.3.1 Factores Etiopatogénicos.

Bajo el término de enfermedades autoinmunes se incluyen patologías muy diversas, tanto desde el punto de vista de sus manifestaciones clínicas como en cuanto a los procesos etiopatogénicos que las originan. En general, se admite que cualquier defecto en alguno de los pasos que regulan la tolerancia inmunológica a componentes propios puede dar origen a una expansión o persistencia de células autorreactivas en cantidad suficiente como para producir enfermedad.

Se desconoce cuál es el origen de la mayoría de estas enfermedades autoinmunes, pero parece sensato pensar que son enfermedades multifactoriales en las que tiene un papel fundamental una especial sensibilidad genética, junto con una serie de factores ambientales desencadenantes.

2.3.2 Factores Genéticos.

La familia de genes más estudiada ha sido la del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que codifica a los antígenos de histocompatibilidad (HLA). El MHC abarca un gran número de genes de histocompatibilidad que presentan un enorme grado de variabilidad estructural, es decir, polimorfismo.

Muchos de estos polimorfismos condicionan el patrón de la respuesta inmune y se asocian a una susceptibilidad de padecer un amplio abanico de enfermedades reumáticas, aunque aún no se ha esclarecido el mecanismo concreto que subyace a esta asociación.

La relación de enfermedades con algunos alelos de las moléculas HLA es bien conocida, tanto para la clase I como para la II; pero hasta ahora no se conoce bien el mecanismo ligado a esta predisposición. Existen varias teorías, las más aceptadas son:

1. En la maduración linfocítica que se realiza en el timo, los linfocitos sufren un proceso de selección que depende de la afinidad del receptor del linfocito T por el HLA⁵. Es posible que en este proceso se seleccionen clones con capacidad autorreactivas que más tarde pueden originar enfermedad.
2. La secuencia antigénica de algunos microorganismos es semejante a algunos epítomos polimorfos del HLA. Una reacción contra el antígeno extraño provocaría, además, una reacción contra moléculas propias como consecuencia de la reacción cruzada.
3. La molécula HLA sería capaz de presentar péptidos antigénicos de manera muy eficiente que además escapara a los mecanismos de autorregulación del organismo.

Por otra parte, se sabe que la herencia de genes predisponentes de autoinmunidad no provoca en la mayoría de los casos síndromes clínicos de autoinmunidad. Esto se puede demostrar mediante estudios de concordancia en gemelos homocigotos para enfermedades autoinmunes.

⁵ http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/temas_nuevos_pdf/tema19.pdf

Cuando un gemelo homocigoto desarrolla una enfermedad autoinmune, la probabilidad de que el otro gemelo desarrolle la misma condición es del orden de uno de cada cuatro (25%), aunque el grado de concordancia presenta una cierta variabilidad en virtud de la enfermedad reumática de que se trate. La concordancia para el lupus eritematoso sistémico (LES) clínico en gemelos homocigóticos es del 24%. Se han registrado concordancias similares en otras enfermedades autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple y la diabetes tipo 1.

Los primeros estudios de concordancia para la artritis reumatoide mostraban unas cifras de aproximadamente el 30% de los pares de gemelos idénticos. Posteriormente, estudios más amplios registraron una concordancia mucho menor, aproximadamente entre un 12% y un 15%. Por tanto, es lógico pensar que otros factores intervienen para que se desarrolle la enfermedad autoinmune. Estos factores podrían ser la diferencia de exposición a factores ambientales relacionados con la enfermedad y a diferencias derivadas de los procesos de desarrollo.

2.3.3 Factores ambientales.

Se dispone de numerosos datos epidemiológicos que vinculan a las enfermedades como la espondilitis anquilosante a factores ambientales muy variados que incluyen infecciones, fármacos, régimen nutricionales, toxinas o situaciones de estrés psíquico. La radiación ultravioleta provoca recaídas en el LES y las lesiones dérmicas de esta enfermedad están generalmente limitadas a las zonas de exposición solar. Muchos fármacos causan hipersensibilidad y lupus inducido por fármacos.

La procainamida, la hidralazina, clorpromacina, difenilhidantoína y muchos otros fármacos pueden inducir la aparición de ANA, fundamentalmente dirigidos contra histonas e, incluso, alguno de los pacientes con estos tratamientos puede desarrollar un lupus inducido.

Otro agente externo estudiado es el cloruro de vinilo, ya que trabajadores expuestos al mismo presentaban con una incidencia mayor de la esperada un síndrome semejante a la esclerodermia; lo mismo ocurre con el aceite de colza. La ingestión de L-triptófano causa una enfermedad infiltrativa eosinofílica. Gran controversia ha planteado la posible relación entre

los implantes de seno de silicona y el desarrollo de esclerodermia y otras enfermedades reumáticas.

La contribución de agentes infecciosos a las espondiloartropatías es un área de continua investigación, aunque las pruebas del papel que desempeña la infección en la espondilitis son en su mayoría epidemiológicas e indirectas, los modelos animales han demostrado la veracidad de esta hipótesis. Se proponen dos posibles mecanismos de acción: el de la actividad cruzada entre el germen y los antígenos propios y el que se basa en la inmunorreactividad que causa la infección.

El concepto de mimetismo molecular propone que los patógenos expresan una extensión de proteína muy similar a un componente del huésped. Este epítipo del patógeno puede ser presentado por las moléculas de histocompatibilidad y activar células T autorreactivas.

Esta activación tiene lugar posiblemente porque el receptor de la célula T tiene una afinidad mayor por la proteína del patógeno que por el componente propio, o bien porque las células T se sensibilizan más fácilmente en el contexto inflamatorio de una infección. Como las células T sensibilizadas y amplificadas tienen un umbral más bajo para la activación, pueden reaccionar contra autoantígenos que ignoraban previamente.

La segunda teoría es la activación inespecífica, la cual propone que los patógenos debilitan la tolerancia inmunológica sin entrar en juego la especificidad antigénica, a ello se puede llegar por varias vías mediante la muerte celular y por tanto liberando antígenos intracelulares, atrayendo y potenciando las células presentadoras de antígeno o, por último, perturbando el equilibrio de las citocinas en el contexto de la inflamación secundaria a la infección.

2.3.4 Criterios y Síntomas de las Enfermedades Autoinmunes.

Criterios Principales de las Enfermedades Autoinmunes.

1. Presencia de autoanticuerpos o datos de reactividad celular contra lo propio.
2. Documentación de autoanticuerpos relacionados en la lesión anatomopatológica.
3. Demostración de los autoanticuerpos o los linfocitos T relacionados pueden provocar lesión hística:
 - a. Transmisión transplacentaria.
 - b. Transferencia adaptable a los animales.
 - c. Efecto en la función celular in vitro⁶.

Síntomas de las enfermedades autoinmunes.

Varían según el tipo de enfermedad, la mayoría coinciden en algunos síntomas como cansancio o fatiga, sensación de malestar crónico y algún tipo de dolor. Muchos pacientes también sienten un sentimiento de impotencia o desánimo al tener un tipo de enfermedad que el médico ya avisa que es crónica y sin esperanza de curación.

Normalmente solo suele haber tratamiento para remitir los síntomas y evitar complicaciones, esto también suele desesperar a los pacientes en la mayoría de medicamentos para las enfermedades autoinmunes tienen a su vez efectos secundarios con lo que poco a poco van empeorando su calidad de vida; a veces algunos pacientes empiezan a desarrollar a la vez otras enfermedades autoinmunes.

⁶ Harrison Principios de Medicina Interna 16 Edición pág. 2154 a 2193.

2.3.5 Clasificación de las Enfermedades Autoinmunes.

Enfermedades autoinmunes sistémicas	Enfermedades autoinmunes localizadas
Artritis reumatoidea y Artritis reumatoidea juvenil (articulaciones; con menor frecuencia, pulmones y piel)	Diabetes Mellitus de tipo 1 (islotos pancreáticos)
Lupus [Lupus eritematoso sistémico] (piel, articulaciones, riñones, corazón, cerebro, células rojas sanguíneas, otros)	Tiroiditis de Hashimoto, Enfermedad de Graves (tiroides)
Esclerodermia (piel, intestinos, con menor frecuencia el pulmón)	Enfermedad celíaca, Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa (tracto gastrointestinal)
Síndrome de Sjogren (glándulas salivales y lacrimales, articulaciones)	Esclerosis múltiple
Síndrome de Goodpasture (pulmones, riñones)	Enfermedad de Addison (adrenal)
Granulomatosis de Wegener (vasos sanguíneos, senos nasales, pulmones, riñones)	Cirrosis biliar primaria, Colangitis esclerosante, Hepatitis autoinmune (hígado)
Polimialgia reumática (grupos musculares importantes)	Arteritis Temporal / Arteritis de células gigantes (arterias de cabeza y cuello)
Síndrome de Guillain-Barré (sistema nervioso)	

2.3.6 Enfermedades Autoinmunes más Comúnmente Diagnosticadas en El Salvador.

A- Lupus Eritematoso Sistémico.

El lupus es una enfermedad reumática sistémica y crónica, es decir, además de afectar a las articulaciones y a los músculos, puede dañar la piel y casi todos los órganos, su base es autoinmune puesto que se produce por la formación de autoanticuerpos; la evolución de la enfermedad se desarrolla en fases de brote y otras en los que los efectos de la enfermedad remiten.

Asimismo, hay lupus muy severos y otros no tan graves como los que se manifiestan con afecciones en la piel. Esta patología afecta principalmente a las mujeres y en una época de la vida en la que se es fértil (entre 20 y 40 años), se han descrito además casos en niños y ancianos.

Tipos de Lupus:

-Lupus Eritematoso Discoide:

Enfermedad crónica y recidivante caracterizada por manchas redondas rojas de bordes bien definidos sobre la piel.

-Lupus Eritematoso Sistémico:

Enfermedad autoinmune con episodios de inflamación en las articulaciones, los tendones y otros tejidos conectivos y órganos.

Diagnóstico.

El diagnóstico se basa principalmente en los síntomas, el análisis de sangre puede detectar anticuerpos antinucleares, presentes en la gran mayoría de las personas que padecen lupus; sin embargo, estos anticuerpos se manifiestan también en otras enfermedades, por lo que si se detectan anticuerpos antinucleares, deben realizarse también pruebas en busca

de los anticuerpos anti-ADN de cadena doble, un valor alto de estos anticuerpos es específico del lupus, aunque no todas las personas que padecen esta enfermedad tienen tales anticuerpos.

El daño al riñón causado por el lupus puede detectarse mediante los análisis de sangre y de orina, aunque en ocasiones la biopsia renal está indicada para determinar mejor el tratamiento.

A causa de la amplia variedad de síntomas, el diagnóstico de Lupus puede ser difícil, y requiere cierta perspicacia por parte del médico que ve inicialmente al paciente. Entre las manifestaciones típicas del LES se incluyen:

- Erupción en las mejillas con aspecto de "alas de mariposa".(Ver anexo N° 4)
- Erupción cutánea en las zonas expuestas al sol.
- Úlceras en el paladar y en las fosas nasales.
- [Artritis](#) de una o más articulaciones.
- Inflamación de riñón (nefritis).
- Afectación del sistema nervioso, incluyendo convulsiones, alteraciones mentales o accidentes vasculares cerebrales (ictus).
- Pueden verse fiebre, adelgazamiento, pérdida del cabello, problemas circulatorios en los dedos de las manos y de los pies, dolor en el pecho al caminar ó con la inspiración profunda y/ó dolor abdominal.
- Anti-SM (presencia de anticuerpos frente al antígeno nuclear de Smith)

Pruebas de Laboratorio.

Son determinantes para establecer el diagnóstico de LES, y se pueden encontrar una serie de alteraciones juntas o por separado:

- Leucopenia menor a 4,000/ mm³.
- Anemia hemolítica con reticulocitosis.
- Un número disminuido de plaquetas, menor a 100,000 .
- Anomalías en análisis de orina.

- Disminución de las proteínas del complemento (un sistema de proteínas del plasma sanguíneo que forma parte del sistema inmunitario).
- Presencia de anticuerpos que no se encuentran en las personas sanas. En especial, los anticuerpos antinucleares (ANA) son casi siempre positivos en el LES.
- Anti-SM (presencia de anticuerpos frente al antígeno nuclear de Smith).

A veces el diagnóstico exacto se retrasa, porque la enfermedad puede evolucionar gradualmente, simulando a su vez otras enfermedades.

Diagnóstico Diferencial.

Otros trastornos del tejido conectivo por ejemplo:

- Artritis Reumatoide
- Enfermedad mixta del tejido conectivo
- Esclerosis sistémica y progresiva.
- Neoplasias metastásicas
- Infecciones.

B- Artritis Reumatoide.

Es un trastorno sistémico caracterizado por inflamación articular crónica, que suele afectar a articulaciones periféricas, se considera una enfermedad autoinmunitaria y se desconoce su causa; el sistema inmunitario del cuerpo normalmente combate las sustancias extrañas, como los virus, pero en una enfermedad autoinmunitaria, el sistema confunde o toma los tejidos sanos como sustancias extrañas y como resultado el cuerpo se ataca a sí mismo.

La artritis reumatoidea se puede presentar a cualquier edad y las mujeres resultan afectadas con mayor frecuencia que los hombres, generalmente afecta a las articulaciones de ambos lados del cuerpo por igual, siendo las muñecas, los dedos de las manos, las rodillas, los pies y tobillos las partes del cuerpo más comúnmente afectadas. El curso y la gravedad de la artritis reumatoidea pueden variar considerablemente, la infección, los genes y las hormonas pueden contribuir a esta enfermedad.

Sintomatología.

La enfermedad generalmente comienza de manera gradual con:

- Fatiga
- Inapetencia
- Rigidez matutina (que dura por más de una hora)
- Dolores musculares generalizados
- Debilidad

Finalmente, aparece el dolor articular, cuando la articulación no está en uso por algún tiempo, se puede tornar caliente, sensible y rígida; cuando el revestimiento de la articulación se inflama, produce más líquido y la articulación se hincha.

El dolor articular a menudo se siente en ambos lados del cuerpo y puede afectar las muñecas, las rodillas, los codos, los hombros, las caderas, los dedos de manos y pies, los tobillos y el cuello (**Ver Anexo N° 5**).

Pruebas de Laboratorio.

- Aumento del factor reumatoide en el 80% de los casos (este factor reumatoide esta en población normal).
- Posible anemia leve.
- En general elevación de los reactantes de fase aguda (VSG, proteína C reactiva).
- Posible leucocitosis leve.
- Líquido sinovial turbio que forma un mal coagulo de mucina; aumento del recuento celular con presencia de polimorfonucleares aumentados.

Diagnóstico Diferencial.

- LES.
- Espondiloartropatia seronegativas.
- Polimialgia reumática.
- Fiebre reumática aguda.
- Esclerodermia.

C- Síndrome Sjögren

Es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por afectar principalmente a las glándulas exocrinas que conduce a la aparición de síntomas de sequedad; las glándulas exocrinas, son las encargadas de producir líquidos como la saliva, las lágrimas, las secreciones mucosas de la laringe y de la tráquea y las secreciones vaginales, tales líquidos son los que hidratan, lubrican y suavizan las partes del organismo que están en contacto con el exterior.

Los síntomas principales son:

- Ojos secos (inyección conjuntival, brillo apagado y reflejo irregular de la luz en la córnea).
- Boca y labios secos (queilosis), eritema lingual, y de otras superficies mucosas, caries dental (Ver Anexo 6).
- Posible aumento de tamaño y disfunción de la glándula salivales, con la subsiguiente dificultad para la masticación y deglución de la comida.
- Puede existir una purpura (no trombocitopenica, hiperglobulinemia y vasculitica).

Pruebas de Laboratorio.

- Pueden existir ANA (mayor al 60% de los pacientes), autoanticuerpos-anti-ss. A y anti-ss. B.
- Eritrosedimentacion elevada.
- anemia normocitica normocromica.
- Estudio de función hepática anormales.
- Microglobulina B elevada.
- Factor reumatoide positivo.

Diagnóstico Diferencial.

- Sarcoidosis.
- Hipofunción salival primaria
- Lesión radioinducida
- Amiloidosis

D- Esclerosis Sistémica.

Trastorno del tejido conectivo, caracterizado por el engrosamiento y fibrosis de la piel, así como la afección variable de varios órganos internos, no se conocen las causas de esta enfermedad; puede aparecer a cualquier edad, aunque es más frecuente en mujeres de mediana edad, se sabe que su incidencia aumenta en grupos de personas expuestos a determinados productos tóxicos, pero en la mayoría de los casos no existe una causa conocida.

Como no es una enfermedad contagiosa ni hereditaria, los familiares o las personas que conviven con el paciente no deben someterse a ningún examen ni a ningún tipo de prevención, esta enfermedad produce lesiones en la piel y también puede producirlas en algunos órganos internos. Al principio estas lesiones consisten en una inflamación, que después se va transformando en un endurecimiento, debido a una acumulación excesiva de unas fibras muy rígidas de colágeno, adquiriéndola piel una consistencia fibrosa.

Por ello a esta enfermedad también se la denomina esclerodermia, cuando estas lesiones afectan a otros órganos, como los pulmones o el tubo digestivo, éstos también se vuelven rígidos y fibrosos y no funcionan correctamente; la esclerosis sistémica además dificulta el riego sanguíneo, al ocluir las pequeñas arterias y capilares que llevan la sangre a los tejidos, y puede producir síntomas y lesiones similares a las de algunas enfermedades circulatorias, como dolor y úlceras en los dedos.

La aparición de síntomas cardiorrespiratorios, como dificultad respiratoria, palpitaciones, dolor en el pecho o la detección de cifras de tensión arterial elevadas, pueden

ser debidos a complicaciones graves de la enfermedad, que casi siempre pueden tratarse de forma eficaz por lo que deben comunicarse de forma urgente al reumatólogo.

(Ver Anexo N° 7)

Pruebas de Laboratorio.

- Anticuerpos antinucleares (patrón homogéneo, moteado o nucleolar).
- Anticuerpos frente a ADN nativo negativo.
- Anticuerpos anti-SM negativos.
- Factor reumatoide positivo en el 30% de los casos.
- Anticuerpos anticentromero en menos del 10% con enfermedad sistémica.
- Anticuerpos nucleares extraíbles anti_ SCL positivos en un 70% en un 30% de los casos.

Diagnóstico Diferencial.

- Amiloidosis
- Fibrosis pulmonar ideopatica
- Hipertensión pulmonar primaria
- Microcardiopatias
- Lupus eritematoso sistémico
- Síndromes superpuestos

E- Diabetes mellitus tipo 1.

Es una enfermedad crónica que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina para controlar apropiadamente los niveles de glucemia. La diabetes tipo 1 solía llamarse diabetes juvenil o insulino-dependiente, este tipo de diabetes puede ocurrir a

cualquier edad, pero se diagnostica con mayor frecuencia en niños, adolescentes o adultos jóvenes.

La insulina es una hormona producida por células especiales, llamadas células beta, en el páncreas, un órgano localizado en el área por detrás del estómago. La insulina se necesita para movilizar el azúcar de la sangre (glucosa) hasta las células, donde se almacena y se utiliza después para obtener energía, en la diabetes tipo 1, estas células producen poca o ninguna insulina.

Sin la insulina suficiente, la glucosa se acumula en el torrente sanguíneo en lugar de entrar en las células y el cuerpo es incapaz de usarla para obtener energía. Al cabo de 5 a 10 años, las células beta del páncreas productoras de insulina están completamente destruidas y el cuerpo ya no puede producir esta hormona.

La causa exacta se desconoce, pero lo más probable es que haya un desencadenante viral o ambiental en personas genéticamente susceptibles que causa una reacción inmunitaria. Los glóbulos blancos del cuerpo atacan por error a las células beta pancreáticas productoras de insulina (Ver Anexo N°8).

Los síntomas principales son:

- Sentirse cansado o fatigado.
- Sentirse hambriento.
- Estar muy sediento.
- Orinar con mayor frecuencia.
- Perder peso sin proponérselo.
- Tener visión borrosa.
- Perder la sensibilidad ó sentir hormigueo en los pies.

Pruebas de Laboratorio.

- Nivel de glucemia en ayunas: la diabetes se diagnostica si es superior a 126 mg/dL en dos ocasiones.
- Nivel de glucemia aleatoria (sin ayunar): la diabetes se sospecha si es superior a 200 mg/dL y el paciente tiene síntomas como aumento de la sed, de la micción y fatiga (esto se debe confirmar con examen en ayunas).
- Prueba de tolerancia a la glucosa oral: la diabetes se diagnostica si el nivel de glucosa es superior a 200 mg/dL después de dos horas.
- Examen de hemoglobina A1c: este examen se ha usado en el pasado para ayudarles a los pacientes a vigilar qué tan bien están controlando sus niveles de glucosa en la sangre.

Diagnóstico Diferencial.

- Diabetes insípida
- Hiperglucemia de estrés
- Diabetes secundaria a fármacos o enfermedades pancreáticas.

2.4 Epidemiología.

Heterogeneidad de patologías:

Es ciertamente remarcable el amplio abanico de enfermedades que tienen a la autoinmunidad como mecanismo etiopatogénico, esta diversidad abarca desde las patologías órgano-específicas, como Tiroiditis de Hashimoto, Enfermedad de Addison, Diabetes Mellitus insulino dependiente, Cirrosis Biliar Primaria ó Anemia Hemolítica Autoinmune, entre otras, hasta las patologías sistémicas, como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), la Esclerosis Sistémica, Síndrome de Sjögren ó Vasculitis Sistémicas.

Plurisintomatología/Multidisciplinaridad:

Cualquier órgano del cuerpo puede verse afectado por patologías autoinmunes y el listado de manifestaciones clínicas cubre prácticamente toda la medicina. Por lo tanto, todas las especialidades y subespecialidades médicas, e incluso quirúrgicas, pueden tener relación con este tipo de enfermedades.

Distribución mundial:

Estas enfermedades afectan tanto a los países desarrollados como a los que están en vías de desarrollo o al tercer mundo. Las diferencias en los casos descritos dependen más de las posibilidades económicas u organizativas para diagnosticar y comunicar en la literatura médica los enfermos que de la prevalencia real.

Sin embargo, existen algunas diferencias en las incidencias de patologías específicas y en las formas de presentación, como lo demuestran algunos grupos internacionales de trabajo que se están creando en los últimos años en distintas partes del planeta.

2.5 Diagnóstico de Laboratorio.

Técnicas mejoradas permiten a los científicos clínicos determinar la integridad del sistema inmune de un paciente, pudiendo evaluar el desbalance cuali-cuantitativo de su activación y expresión. Los procedimientos aplicados en el diagnóstico siempre evolucionan, ya que las áreas de investigación básica y clínica aportan nuevos datos sobre los pacientes.

El diagnóstico inmunológico del laboratorio puede reafirmar ó excluir un diagnóstico específico ó subclasificar un problema clínico. En desórdenes crónicos para los cuales ha sido establecido un diagnóstico, las pruebas de laboratorio ayudan a establecer el nivel de actividad de la enfermedad; sin embargo, los tests en uso en la actualidad poseen diferente sensibilidad, especificidad y poder predictivo, las muestras de sangre son los mejores especímenes de

trabajo, sin embargo, deben considerarse los posibles inconvenientes inherentes a la toma de muestra.

Las enfermedades que nos ocupan son relativamente comunes, cada una tiene muchos marcadores de laboratorio que la identifican y que son usados para el diagnóstico clínico y la decisión en el tratamiento; además de los tests inmunológicos existen procedimientos bioquímicos y hematológicos que pueden ser de igual importancia en la determinación y seguimiento de estas enfermedades, virtualmente todas tienen asociadas actividades de anticuerpos específicos, pudiendo establecerse así un criterio para el diagnóstico.

2.5.1 Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia (IF) es una técnica que emplea anticuerpos conjugados a fluorocromos, estas son moléculas que al ser excitadas con la energía de una determinada longitud de onda son capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor.

Las pruebas de inmunofluorescencia (IF) se basan en que cualquier antígeno puede ser marcado específicamente con un fluorocromo coloreado, a través de un anticuerpo (Ac) específico, cuando se irradia este elemento con luz ultravioleta o azul se hace fluorescente.

En la década de 1940 se inicia la implementación de las dos técnicas:

A. Inmunofluorescencia Directa:

Sobre un porta objeto depositamos una muestra en la que buscamos la presencia de un determinado antígeno, añadimos un suero específico del antígeno problema marcado con isotiocinato de fluoresceína (conjugado); si el antígeno problema se encuentra presente en la muestra se une el conjugado. En caso contrario el conjugado se elimina con un lavado del portaobjetos. (Ver Anexo N° 9)

B. Inmunofluorescencia Indirecta:

Se trata de una técnica microscópica cuya base es una reacción inmunológica con marcador fluorescente. Algunas sustancias químicas absorben energía de ondas ultravioleta y la emiten como ondas visibles de distinta longitud de onda, por ello se observan de distinta coloración en función de la longitud de onda de la luz recibida, a esta característica se le denomina fluorescencia. (Ver Anexo N° 9)

En particular, la técnica consiste en incubar el antígeno (parámetro) a valorar de la muestra, con un anticuerpo específico que se encuentra fijado a un cubreobjetos, luego se le añade un anti-anticuerpo marcado con el fluorocromo que se unirá al complejo fijado al portaobjeto, y tras una nueva incubación y un lavado se visualiza la positividad o no del ensayo visualizándolo en un microscopio con lámpara ultravioleta.

2.6 Anticuerpos Antinucleares (ANA).

Son anticuerpos dirigidos contra autoantígenos localizados en el núcleo celular, pueden clasificarse de acuerdo con la estructura reconocida, en anticuerpos dirigidos contra nucleosomas (anti-DNA, antihistonas, anti-DNP o complejo DNA-histona), proteínas no histonas asociadas al ADN (anticentrómero, anti-Scl70, anti Ku, antiláminas nucleares, anti-HMG, anti-PCNA y otros), proteínas no histonas asociadas al ARN (anti-Sm, anti-U1 RNP, anti-Ro/SS-A, anti-La/ SS-B, anti-Jo-1 y otros anti-ENA) y nucléolos (antinucleares).

Ese grupo de proteínas no histonas asociadas al ARN que pueden solubilizarse y extraerse de los tejidos con soluciones salinas de baja fuerza iónica, son los llamados Anticuerpos Antiantígeno Extraíbles del Núcleo (ENAs). Algunos resultados dan excelente valor diagnóstico a los ANA realizados por IFI, alcanzando hasta el 100% de sensibilidad en pacientes con LES.

Los autoanticuerpos más característicos del LES son los que reaccionan con los componentes del núcleo celular, por lo que las pruebas de tamizaje más sensibles para el LES

son los ANA por IFI, los cuales permiten la detección de anticuerpos aproximadamente frente a 100 especificidades en el núcleo.

No obstante la mayor sensibilidad de la IFI es sobre líneas epiteliales (por ejemplo, la Hep-2) para la detección de los ANA, demostrándose una sensibilidad mayor de este método sobre cortes de criostato de hígado de roedor, otra de las técnicas utilizadas para la detección de estos anticuerpos; el sustrato es uno de los tres parámetros evaluados para la adecuada interpretación de los ANA. El otro criterio a tener en cuenta para la interpretación de los resultados son los títulos de los anticuerpos, pues la cantidad de éstos y su especificidad tienen valor significativo en la interpretación.

Generalmente, los ANA son negativos o muy bajos en personas jóvenes y sanas, Se encuentran elevados en pacientes con enfermedades sistémicas del tejido conectivo y existen en títulos intermedios en algunos pacientes con enfermedades del tejido conectivo como también en personas con una amplia variedad de condiciones: ancianos, embarazo, otras enfermedades autoinmunes (cirrosis biliar primaria, tiroiditis autoinmune) drogas (procainamida, hidralazina), infecciones crónicas, neoplasias y en personas sanas.

Según la prevalencia de ANA en la población sana, títulos de 1:80 o menos no son de valor diagnóstico a causa de la alta prevalencia de hallazgos positivos hasta estos títulos en la población general. Un punto de corte razonable es alrededor de 1:160 a 1:320.

Estos títulos o mayores ayudan a confirmar el diagnóstico clínico de una enfermedad del colágeno. Existen, sin embargo, personas sanas con títulos mayores de 1:320. Entonces el diagnóstico de una enfermedad del tejido conectivo no debe ser hecho solamente por los títulos de ANA.

El tercer parámetro a analizar en la interpretación de los ANA es el patrón de los anticuerpos, el cual está asociado con algunas enfermedades y que en los sitios donde no se encuentra disposición de otros parámetros inmunodiagnósticos, nos puede sugerir la patología causante del desequilibrio.

2.6.1 Historia De Los Anticuerpos Antinucleares.

Durante la práctica médica en reumatología y en otras áreas de la medicina con frecuencia se busca identificar anticuerpos dirigidos contra algunos componentes antigénicos nucleares, estos anticuerpos se han relacionado con algunas enfermedades y con el tipo de alteraciones que ellas presentan; Las técnicas empleadas para identificar estos anticuerpos han ido variando y mejorando a medida que se amplía el conocimiento en ellos. Se presentan los aspectos históricos más importantes que se dieron en el desarrollo de las técnicas para identificar estos anticuerpos.

Desde 1949 hasta 1951 se demostró que el suero de pacientes con lupus era capaz de inducir alteraciones características en las células in vitro, estas alteraciones incluyen aumento de tamaño de algunas células blancas y la aparición de cuerpos que parecen núcleos grandes en el citoplasma de otros polimorfonucleares intactos.

Pero era indispensable averiguar cómo se producían los cambios celulares y morfológicos a través del factor sérico o gamaglobulina, estos hallazgos fueron confirmados un año después por Lee, Michael y Vural; los estudios de Miescher y Fauconnet y de grupos de Cepellini y Seligmann, a través de las técnicas de absorción y precipitación, y utilizando el factor sérico ya descrito, produjeron una precipitación del ADN humano, de animales y de bacterias, utilizando soluciones muy diluidas (entre 3 y 15 lambdas de ADN por ml) y el suero de los pacientes lúpicos.

Produjeron también una reacción específica contra el ADN pero no con el ARN, utilizando varias técnicas como la de Öuchterlony, la hemaglutinación pasiva y la inmunoelectroforesis.

Posteriormente se analizó el concepto de anticuerpos antinucleares que Halsted Holman, de Stanford University Medical Center, en el libro "Inflammation and Diseases of Connective Tissue" define como "anticuerpos circulantes que reaccionan contra varios constituyentes químicos del núcleo celular" y que además varios de estos anticuerpos antinucleares reaccionan contra el núcleo de las células intactas, contra la desoxirribonucleoproteína, contra el ácido desoxirribonucleico aislado y contra las histonas.

A mediados de la década de 1950, se definía la relación entre el factor sérico (anticuerpos antinucleares), la célula L. E. y los fenómenos que se presentaban a nivel del núcleo. Rifkind y Gabriel C. Godman de Columbia University, en 1957 utilizando el microscopio de contraste de fase demostraron la secuencia del fenómeno L. E. sin embargo, la importancia de las células L. E. en el diagnóstico de lupus empezó a perderse cuando Kievits y Cols demostraron en 1956 que el 16% de los pacientes con artritis reumatoide las presentaban, esto creó dudas sobre la especificidad de la reacción para el diagnóstico de lupus.

Cinco años después Naomi Rothfield y Cols, en 1961 demostraron que las células L.E no se encuentran en la cuarta parte de los pacientes con lupus, lo que muestra una pobre sensibilidad.

En 1957 Halsted Holman y Henry Kunkel del Rockefeller Institute for Medical Research de Nueva York demostraron la afinidad del factor sérico al núcleo celular y a la nucleoproteína o al ADN; este reporte es un descubrimiento crucial para el inicio y la utilidad del laboratorio en inmunología para el diagnóstico del lupus. En este artículo en una nota agregada al final, este par de investigadores señalan que George Friou de West Haven, Connecticut, ha utilizado la técnica de los anticuerpos fluorescentes y ha obtenido resultados parecidos⁷.

Previamente Deith, Godman y Klemperer en varios estudios entre 1955 y 1957 demostraron que la gamaglobulina LES entra al núcleo e induce los cambios mencionados anteriormente y plantean que la gamaglobulina podría ser inmunológicamente reactiva.

Con los estudios de Coons Godman, Deitch, Holman y Kunkel, se crearon las bases para el entendimiento de la inmunofluorescencia que George Friou logró desarrollar, estableciendo una base sólida para el diagnóstico del lupus y de las enfermedades autoinmunes en el laboratorio.

⁷ Antonio Iglesias Gamarra & Cols. Revista Colombiana de Reumatología.

2.6.2 Significado Inmunológico de los Diferentes Patrones de la Inmunofluorescencia.

Mediante esta técnica los autoanticuerpos pueden dar lugar a una tinción nuclear ó citoplasmática, las variaciones en los patrones de la inmunofluorescencia a nivel de los núcleos celulares muestran que los sueros de los individuos contienen anticuerpos que reaccionan contra los diferentes antígenos que tienen otras localizaciones dentro del núcleo celular, siempre y cuando la sección del espécimen se prepare de la misma manera.

(Ver Anexo N°12)

A. Patrón Homogéneo.

Es el patrón observado con mayor frecuencia en las enfermedades del tejido conectivo pero también el más inespecífico. J. Swanson Beck de Escocia fue uno de los primeros investigadores en relacionar este patrón a las nucleoproteínas, complejos ADN – histonas.

Lachmann y Kunkel fueron los que puntualizaron que el anticuerpo estaba dirigido contra las nucleoproteína, pero también el patrón homogéneo se puede observar cuando hay anticuerpos contra las histonas y en algunos casos de anticuerpos anti-DNA de doble cadena. Se observa especialmente en el Lupus, Artritis Reumatoide, Esclerodermia, Polimiositis, Dermatomiositis, Síndrome de Sjögren primario y la Hepatitis Crónica Activa.

B. Patrón Moteado.

Se caracteriza por la presencia de puntos de fluorescencia en toda la extensión del núcleo; inicialmente se describía que eran anticuerpos dirigidos contra las proteínas nucleares solubles en la solución salina, especialmente por parte de Beck, Lachmann y Kunkel y el del grupo de Bonomo, Tursi y Dammacco. Posteriormente Beck en 1962 utilizó un buffer de fosfato para identificar el antígeno, pero sólo fue caracterizado por Eng Tan y Henry Kunkel en 1966.

C. Patrón Periférico.

Casals, Friou y Teugue describieron el patrón periférico al observar una mayor intensidad alrededor de la membrana nuclear y una menor tinción en el centro del núcleo. En 1987 y 1988, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se describe la presencia de anticuerpos dirigidos contra varios componentes antigénicos de la membrana nuclear, produciendo un patrón periférico.

D. Patrón Nucleolar.

Unicamente se colorean los nucléolos, posiblemente por anticuerpos que reaccionan con el ARN nucleolar. Es más común en esclerodermia, principalmente en títulos superiores a 1:10000, también se encuentran en otras entidades como LES, S.sjögren, fenómeno de Raynaud.

E. Patrón Centromérico.

Parecido al patrón moteado pero con características especiales, la fluorescencia “como cabezas de alfiler” los núcleos se tiñen como puntos finos distribuidos de manera homogénea en el nucleoplasma de las células en interface. La tinción en las células en división muestran un punteado fino localizado en la placa de la cromatina generalmente como 40 a 60 por núcleo, las células en mitosis tienen el mismo patrón de fluorescencia.

F. Patrón Citoplasmático.

Se define como tinción homogénea que cubre todo el citoplasma aunque en ocasiones es difusa se debe reportar para orientación del clínico, ya que son anticuerpos dirigidos contra ciertas proteínas citoplasmáticas y ácidos ribonucleicos.

Los patrones citoplasmáticos más reconocidos son: Mitocondrial, ribosomal, anti actina y anti vimentina.

G. Patrón Mitocondrial.

Se caracteriza por una tinción granular en hileras punteadas que rodean al núcleo y se extienden hacia el citoplasma sin cubrirlo por completo.

2.6.3 Relación de los Patrones de Inmunofluorescencia Con las Enfermedades Autoinmunes.

Patrones de fluorescencia de los ANA	Antígenos	Enfermedades asociadas
Homogéneo (difuso)	Complejos histona-DNA (nucleosoma)	LES, lupus farmacológico
Periférico	dsDNA, laminina	LES, hepatitis autoinmune
Moteado	Sm, RNP, Ro/SSA, La/SSB, Scl-70, RNA polimerasa, otros	LES, Síndrome de Sjögren, EMTC, esclerodermia
Moteado polimórfico (PCNA)*	Antígeno celular de células proliferantes	LES
Centromérico	Cinetocoro	Esclerodermia limitada, fenómeno de Raynaud, cirrosis biliar primaria
Nucleolar	RNA nucleolar	Esclerodermia, esclerodermia-miositis
Citoplasmático	Histidil-tRNAsintetasa (Jo-1), P ribosomal, mitocondrias	Polimiositis, LES, cirrosis biliar primaria

* Este patrón varía de homogéneo a moteado discreto según la fase del ciclo celular LES, lupus eritematoso sistémico; EMTC, Enfermedad mixta del tejido conectivo.

2.7 Pruebas Especiales.

2.7.1 Anticuerpos anti-ADN.

Los anticuerpos al ADN son de importancia central en nuestro entendimiento de un mecanismo por el cual los anticuerpos pueden estar relacionados con la patogénesis. En ciertos pacientes, se ha demostrado que el anticuerpo al ADN fue seguido por la aparición de antígeno ADN circulante y la desaparición del anticuerpo por precipitación, sugiriendo la formación de complejos inmunes circulantes.

Existen tres subgrupos:

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

Para su detección, numerosas técnicas se han utilizado, variando desde la fijación de complemento (1957) a inmunofluorescencia -IFI- (1975) y más recientemente a ADN-microarreglos (2000).

2.7.2 Anticuerpos anti-Histona.

Los anticuerpos anti-Histona (AaH) se dirigen frente a los componentes proteicos de los nucleosomas, los complejos ADN-proteínas, que forman la estructura de la cromatina, transcripcionalmente inactiva.

Se encuentran en el núcleo, en una estructura altamente organizada consistente en 3 subunidades, dos dímeros H2A-H2B los cuales rodean un tetrámero H3-H4 y con este complejo proteico entero rodean la tercera subunidad la cual comprende aproximadamente 2 giros de ADN. Cada nucleosoma está unido por un conector de longitud variable el cual está asociado con histona H1.

Los anticuerpos a todas las clases de histonas de mamíferos están presentes en LES, pero no están restringidas a esta enfermedad, ya que también han sido detectados en autoinmunidad inducida por drogas, artritis reumatoide y enfermedad del tejido conectivo no diferenciado. Tiene interés histórico y clásico por su responsabilidad en la generación de células LE.

Sus primeras determinaciones fueron por técnica de fijación de complemento. Un método de IFI fue introducido por el Dr. Tan en 1976, basado en el principio que las histonas son extractables del tejido con ácido clorhídrico diluido (0.1 normal) sin cadenas de ADN.

El inmunoensayo de fase sólida también ha sido utilizado para detección de anticuerpos antihistona (AaH). La unión de histonas o subfracciones de ésta a superficies de poliestireno junto a la unión de anticuerpos con isótopos marcados es detectada.

2.7.3 Anticuerpos anti-Sm y RNP.

Las características bioquímicas e inmunológicas de los antígenos Sm y RNP nuclear fueron dilucidadas por los estudios importantes de Lerner y Steitz quienes introdujeron las herramientas de biología molecular dentro de este campo y mostraron que estos autoantígenos eran partículas subcelulares compuestas de una especie de pequeños complejos nucleares RNAs (U-RNAs) con proteínas.

Este grupo de autoanticuerpos fue ilustrativo en mostrar que el RNP estaba involucrado en el empalme de precursores de RNA mensajero.

Aunque la estructura molecular de los antígenos de RNP y Sm reconocidos por los autoanticuerpos del LES han sido mostrados como complejos de U-RNAs y proteínas, los determinantes antigénicos son las proteínas y no el componente RNA.

Los anticuerpos al Sm y al RNP han sido detectados por inmunodifusión radial, la cual tiene alta especificidad y baja sensibilidad; actualmente ELISA es alta en sensibilidad y baja en especificidad.

Todos los anticuerpos anti-RNP muestran un patrón nuclear granular distinto por IFI, reflejo de la distribución focal de los snRNP de los espliceosomas en el nucleoplasma; las partículas individuales y los epítomos proteínicos pueden ser determinados por inmunoprecipitación o inmunoblot.

2.7.4 Anticuerpos a SS-A/Ro y SS-B/La.

Dirigidos contra partículas ribonucleoproteínicas distintas; Ro se compone de una proteína de 60 kDa asociada a pequeños RNA conocidos como RNA hY1, hY3, hY4 y hY5108, la una ribonucleoproteína de 43 kDa a 52 kDa, toma parte en la regulación transcripcional del RNA polimerasa III así como también de algunos RNA mensajeros (RNAm).

Los auto-anticuerpos a partículas subcelulares a SSA/ Ro y SS-B/La son encontradas en Síndrome de Sjögren (SS) y LES. El antígeno Ro fue aislado por primera vez de extracto de bazo humano y fué identificado en una precipitación por inmunodifusión con anticuerpos de pacientes con LES; este estudio fué extendido y el antígeno La fué también identificado en extracto de bazo humano con suero de LES.

En adición al LES y Síndrome de Sjögren el Ro está presente en alta frecuencia en un subgrupo clínico de LES llamado Lupus Cutáneo subagudo, muchos de estos pacientes han sido falsamente titulados ANA negativos; adicionalmente el antígeno Ro parece variar en cantidad en célula de diferentes especies así, que si el sustrato usado para IFI tenía un bajo contenido del antígeno, el ANA podría ser interpretado como negativo.

El antiRo también está altamente asociado con el Lupus neonatal, una forma de Lupus en la cual está relacionado la transferencia transplacentaria de autoanticuerpos IgG de la madre al niño y manifestado en éste como un rash cutáneo y bloqueo cardíaco congénito.

2.8 Definición de Términos Básicos.

Anticuerpo.

Proteína producida por linfocitos B tras estimulación por un antígeno, actúan específicamente contra él en respuesta inmune. Equivalente a inmunoglobulina.

Antígeno:

Molécula presente en microorganismos o células capaces de inducir una respuesta inmune.

Aloantígeno.

Antígeno procedente de un individuo de la misma especie pero genéticamente distinto que provoca al inyectarlo una respuesta inmune.

Autoanticuerpo.

Anticuerpo dirigido contra antígenos propios.

Autoinmunidad.

Reacción inmunitaria contra sus propios antígenos o tejidos del propio cuerpo.

Anticuerpos antinucleares (ANA)

Constituyen un amplio grupo de Autoanticuerpo dirigido contra ciertos componentes nucleares.

Autoactividad.

Fenómeno fisiológico que, en baja intensidad, acontece en todos los individuos, si bien se encuentra bajo un estricto control del sistema inmune.

Autoantígenos

También llamados proteínas del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), son un conjunto de proteínas de la membrana celular, específicas de cada individuo. Suponen un "carné de identidad molecular", que hace posible que las células de nuestro sistema inmunitario reconozcan a nuestras células como propias y no las ataquen.

Célula T.

Tipo de célula inmunitaria que puede atacar células extrañas, células cancerosas y células infectadas por un virus. Las células T también pueden ayudar a controlar las respuestas inmunitarias. Una célula T es un tipo de glóbulo blanco. También se llama linfocito T y timocito.

Citosol.

Llamado hialoplasma, es el medio acuoso del citoplasma en el que se encuentran inmersos los orgánulos celulares.

Citoquinas.

Proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares.

Epítopo ó Determinante Antigénico.

Porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia específica al que se unen los anticuerpos.

Fagocitosis.

Proceso por el cual una célula engulle partículas para su nutrición o para degradarlas o eliminarlas. Células del sistema inmunológico, como neutrófilos y macrófagos, se encargan de eliminar algunos microbios de esta manera.

Fluorescencia.

Propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano), son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor al incidente.

Hapteno.

Sustancia química de pequeño peso molecular (menos de 10.000 dalton) que no induce por sí misma la formación de anticuerpos pero al unirse a una proteína transportadora (ej. Albumina) estimula una respuesta inmunitaria. En resumen un hapteno es la parte de un antígeno que por sí sola no dispara respuesta inmune, pero sí posee especificidad.

Inmunidad.

Término médico que describe el estado de tener suficientes defensas biológicas para evitar la infección, enfermedad u otra invasión biológica no deseada.

Inmunoglobulinas.

Tipo de proteínas plasmáticas producidas por el sistema inmune en respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas que pueda ser una amenaza para el organismo: como químicos, partículas de virus, esporas o toxinas de las bacterias.

Inmunofluorescencia

Técnica que emplea anticuerpos conjugados a fluorocromos. Los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas con la energía de una determinada longitud de onda son capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor.

Inmunofluorescencia indirecta.

Técnica en el que el anticuerpo que reconoce el antígeno no está marcado sino que se utiliza un segundo anticuerpo conjugado con el fluorocromo y dirigido contra la especie del primero.

CAPÍTULO III

SISTEMA DE HIPÓTESIS

3. SISTEMA DE HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis de Investigación.

Hi: Los pacientes que consultan el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales tienen un alto porcentaje de positividad a la presencia de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.

3.2 Hipótesis Nula.

Ho: Los pacientes que consultan el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales no tienen un alto porcentaje de positividad a la presencia de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.

3.3 DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS HIPÓTESIS.

HIPOTESIS	VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES
<p>Hipótesis de Investigación (Hi).</p> <p>Los pacientes que consultan el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales tienen un alto porcentaje de positividad a la presencia de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.</p> <p>Hipótesis Nula (Ho).</p> <p>Los pacientes que consultan el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales no tienen un alto porcentaje de positividad a la presencia de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.</p>	<p>VI:</p> <p>Presencia de Anticuerpos Antinucleares.</p>	<p>Anticuerpos Antinucleares:</p> <p>Constituyen un amplio grupo de autoanticuerpos dirigido contra ciertos componentes nucleares.</p>	<p>Identificación de Anticuerpos Antinucleares.</p>	<p>Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Resultado 2. Dilución 3. Patrones <p>Núcleo:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Homogéneos -Moteado fino ó Grueso -Nucleolar. -Centrómerico <p>Citoplasma:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Citoplasmático -Mitocóndrial. -Huso Mitótico

CAPÍTULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO

4. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.

4.1 Tipo de Investigación.

Según el tiempo de ocurrencia de los hechos y registro de la información, la investigación que se realizó es de tipo:

- **Prospectiva.**

Ya que el estudio registró los hechos que ocurrieron a medida que realizamos la investigación.

- **Transversal**

Debido a que las variables fueron estudiadas simultáneamente en un periodo de tiempo determinado y sin ningún seguimiento posterior.

Según el análisis y los métodos de obtención de resultados, la investigación también fué:

- **De Laboratorio y de Análisis:**

Ya que los datos se obtuvieron a partir de la recolección, procesamiento de las muestras de suero obtenidas de los pacientes que consultaron el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.

4.2 Población.

Estuvo conformada por los pacientes que consultaron el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador, la cual fué de 150 pacientes.

4.3 Muestra.

La muestra que se tomó para realizar el estudio durante el período de marzo a julio de 2010 estuvo constituida por 150 pacientes que asistieron al servicio de reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.

La escala utilizada para delimitar la muestra en la interpretación de los resultados es la siguiente:

ESCALA DE VALOR	
$\leq 25\%$	BAJO
$>25\%$	ALTO

Criterios de Inclusión.

- Pacientes que visiten el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales.
- Pacientes diagnosticados con sintomatología sugestiva a enfermedades autoinmunes.
- Pacientes que cumplieron con los criterios considerados como de riesgo, evaluados por el médico.
- Historia clínica y/o genética familiares en caso de contar con ella.

Criterios de Exclusión.

- No ser paciente proveniente del servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales.
- Pacientes que no fueron diagnosticados previamente con sintomatología sugestiva a enfermedades autoinmunes.
- Pacientes que no cumplieron con los criterios considerados para la realización de la prueba en estudio.
- Muestras de pacientes inaceptables.

4.4 Tipo de Muestreo.

No probabilístico:

Por conveniencia, ya que no se realizó ningún sorteo para la elección de la muestra se consideró únicamente a pacientes que presentaban algún signo o síntoma sugestivo a una de las enfermedades autoinmunes.

El muestreo tuvo una duración de cuatro meses en los cuales realizamos la toma y el procesamiento de las muestras para la investigación.

4.5 Técnicas de Obtención de Datos.

A. Técnicas Documentales:

Realizamos una revisión bibliográfica a través de libros, sitios electrónicos, revistas, entrevistas a médicos reumatólogos e información estadística proporcionada por el Hospital Nacional Rosales sobre Anticuerpos Antinucleares, Enfermedades Autoinmunes y la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta utilizada en nuestra investigación, obteniendo así los conocimientos necesarios sobre el tema que nos permitiera elaborar el marco teórico que fundamenta la investigación.

B. Observación directa:

Es directa porque como investigadores estuvimos en contacto personalmente con el hecho o fenómeno investigado.

4.6 Técnicas de Laboratorio.

Técnica de detección de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.

Instrumentos.

- Libreta de apuntes.
- Cámara fotográfica.
- Grabadora.

4.7 Equipo, Material y Reactivo:**Equipo:**

- Microscopio de luz fluorescente.
- Rotador.
- Cámara húmeda.
- Incubadora.
- Centrífuga.
- Baño maría.
- Agitadores.

Material:

- Bolsa de Tampón de PBS.
- Medio de Preparación.
- Jarra de Coplin.
- Matraz Volumétrico 1000 ml.
- Pipeta Pasteur.
- Láminas.
- Tubo de vidrios.
- Puntas.
- Ligas.
- Pipetas de 1 ml.
- Pipetas de 5 ml.
- Lentes Protectores.

- Gabacha protectora.
- Jeringas de 5ml
- Alcohol al 70%
- Algodón
- Jabón antiséptico
- Lejía
- Guantes
- Mascarillas

Reactivos:

- Controles positivos y Negativos.
- Reactivo de Fluoresceína.
- Colorante de Contraste de Azul de Evans al 0.5%.
- Medio de Montage.

4.8 Procedimiento.

Planeación.

En el Departamento de Medicina de la Facultad Multidisciplinaria Oriental, reunidos los estudiantes egresados de las carreras de tecnología médica y la Coordinadora del Proceso de Graduación, con el fin de conocer los lineamientos a seguir en el desarrollo del trabajo de grado.

En dicha reunión se formaron los grupos de trabajo, se eligieron los docentes directores y se explicaron las etapas que conlleva el proceso. Posteriormente en reunión con la docente director se seleccionó el tema a investigar y la zona en la que se realizaría la investigación.

Se decidió realizar la investigación en el Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador ya que se nos proporcionó información de parte del Jefe de Laboratorio y Jefe de Área de Pruebas Especiales para poder realizar un trabajo de tesis sobre

Determinación de Anticuerpos Antinucleares (ANA) ya que dicha investigación ayudará a saber la frecuencia de los Patrones de ANA que ayuden para la orientación en el diagnóstico de pacientes con cuadro clínico sugestivo a una enfermedad autoinmune.

Se realizó una revisión bibliográfica sobre el tema de interés para recopilar información sobre las enfermedades autoinmunes y la pruebas a utilizadas en dicho estudio. Además se inició la búsqueda de asesoría y orientación sobre el tema a investigar y de las pruebas utilizadas para esto se solicitó ayuda al Laboratorio del Hospital Nacional Rosales.

Posteriormente se elaboró el Perfil de Investigación siguiendo los lineamientos adecuados para su desarrollo y ser presentado de forma escrita. Además se procedió a la realización del Protocolo de Investigación siguiendo los lineamientos antes requeridos por el docente asesor el cual se presentó en forma escrita.

Ejecución.

Esta fase se inicio realizando una recopilación de las boletas de los pacientes que han sido previamente citados que asisten a la consulta del Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales.

Posteriormente se preparó a los pacientes para obtención de la muestra por punción venosa de la siguiente manera:

- Lavar, secar y colocarse guantes.
- Identificar el tubo de acuerdo a la solicitud.
- Explicar a los pacientes sobre el procedimiento que se le va a realizar.
- Sentar cómodamente al paciente para la extracción de la muestra.
- Seleccionar la vena apropiada para la punción.
- Realizar la asepsia con torunda de algodón humedecida con alcohol.

- Colocar el torniquete firmemente alrededor del brazo y pedir al paciente que abra y cierre las manos.
- Proceder a puncionar la vena seleccionada.
- Colocar la aguja con el bísel hacia arriba sobre la vena a puncionar.
- Introducir la aguja en el centro de la vena y penetrar a lo largo de la vena de 1.0 a 1.5 cm.
- Tirar hacia atrás el émbolo de la jeringa muy lentamente para que penetre la sangre.
- Retirar el torniquete tirando el extremo doblado y colocar una torunda de algodón sobre la piel.
- Extraer la aguja con un movimiento rápido por debajo de la pieza de algodón.

Seguidamente, se colocó en un tubo sin anticoagulante la muestra de sangre y se dejó reposar para la retracción del coágulo para obtener suero mediante el proceso de centrifugación. Posteriormente con la muestra ya centrifugada se procedió a realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta HEP-2. (Ver Anexo N°10)

Procedimiento de análisis de ANA por Inmunofluorescencia HEP-2

A. Del Tampón:

Disuelva el contenido de una bolsa de tampón en un litro de agua desionizada o destilada.

El tampón PBS se puede tapar y conservar entre 2 y 10°C durante cuatro semanas como máximo.

B. Dilución de las Muestras del Paciente:

Agregar 395µl del buffer fosfato más 5µl de muestra de cada paciente, se mezcla y se obtendrá una dilución 1:80 homogénea.

Prepare series de diluciones de la muestra o muestras de selección (por ejemplo: 1:160, 1:320 ó 1:2560).

C. Preparación de los portaobjetos con sustrato:(20-25µl/pocillo)

Saque los portaobjetos de las bolsas y disponga los sueros de control en los pocillos de control, como se indica: Invierta el frasco cuentagotas de control y apriete hasta que se vea una gota en la punta.

Toque suavemente el pocillo de control con la gota, evitando que la punta del cuentagotas entre en contacto directo con la superficie del portaobjetos. Añada una gota (20-25µl) de muestra de paciente a los pocillos numerados.

Los siguientes pocillos enumerados según la muestras se les agregaran 20µl de esta dilución.

Nota: Para la selección general se recomienda el control positivo homogéneo. Para la titulación semicuantitativa elija el control positivo cuyo patrón de fluorescencia sea más parecido al de la muestra de selección (por ejemplo: para una muestra de paciente que presente un patrón de fluorescencia moteado en la selección, utilice un control positivo moteado).

Precaución: Si la punta del cuentagotas toca directamente la superficie del portaobjetos, se puede dañar el sustrato de antígeno.

D.Incubación de los portaobjetos: (30 ± 5 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24°C)

Ponga los portaobjetos en una cámara cubierta y húmeda (Bastará con una placa de Petri con una toalla de papel humedecida). Incube con la tapa puesta durante 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente (18-24°C).

E.Enjuague con PBS:

Saque los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y aclárelos brevemente con PBS utilizando una jeringa o una pipeta de Pasteur o serológica. No utilice la jeringa directamente sobre los pocillos.

Nota: Para evitar la contaminación cruzada de los portaobjetos con 10 pocillos, dirija el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, inclinándolo primero hacia los pocillos 1-5 y luego hacia los pocillos 6-10.

F.Lavado con PBS: (10 minutos):

Lave los portaobjetos con PBS durante 10 minutos, en una placa de tinción de portaobjetos o en una jarra Coplín.

Este lavado puede durar de 10 a 30 minutos sin que varíen los resultados finales. Una vez utilizada, tire la solución de lavado PBS.

G.Reactivo fluorescente para detectar anticuerpos:

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérgalos de 3 a 5 veces en agua desionizada o destilada. Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.

Vuelva a colocar de inmediato el portaobjetos en la cámara de incubación y cubra los pocillos por completo con el reactivo fluorescente Azul de Evans para detectar anticuerpos; empiece por poner una gota en cada pocillo. Repita la operación en cada portaobjetos.

El reactivo fluorescente para detectar anticuerpos ha sido titulado para compensar el agua desionizada o destilada residual que queda en el portaobjetos tras el enjuague.

Nota: Es importante que los pocillos del portaobjetos no se sequen durante este procedimiento, pues se podría dañar el sustrato. **NO SEQUE EL PORTAOBJETOS NI DEJE QUE PASEN MÁS DE 15 SEGUNDOS SIN AÑADIR EL REACTIVO.**

H.Incubación de los portaobjetos: (5-10 minutos a temperatura ambiente, es decir, entre 18 y 24°C)

Ponga la tapa de la cámara de incubación y cúbrala con una tapadera toalla de papel para impedir la exposición a la luz, si la cámara no es opaca.

Deje que los portaobjetos se incuben 30 minutos (\pm 5 minutos) a temperatura ambiente (18-24°C).

I.Enjuague con PBS:

Retire los portaobjetos de la bandeja de la incubadora y enjuáguelos brevemente con PBS por simple inmersión varias veces.

J.Preparación de los cubreobjetos:

Saque los portaobjetos del PBS de uno en uno y sumérjalos de 3 a 5 veces en agua desionizada o destilada. Pase un papel secante o una toalla de papel por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.

No seque el portaobjetos ni deje que pasen más de 15 segundos sin poner el cubreobjetos. Añada 4 ó 5 gotas de medio de montaje en la línea media de cada portaobjetos.

Coloque el cubreobjetos con cuidado, evitando que se formen bolsas de aire, haciendo bajar suavemente el cubreobjetos de un lado del portaobjetos al otro. (Ver Anexo N°11)

Interpretación De Los Resultados Del Paciente

Se recomienda un aumento total de 200X para la detección selectiva de positivos y negativos, y de 400X para el reconocimiento de patrones y la visualización de células mitóticas.

Control De Calidad

Para el control de calidad se dispondrán los controles positivo, negativo en los pocillos al efecto que se encuentran en todos los portaobjetos.

El Control Positivo debe dar una fluorescencia de color verde manzana en los núcleos de las células, con un patrón claramente discernible característico del suero de control utilizado.

El Control Negativo debe dar una fluorescencia inespecífica de color verde mate en el citoplasma y en el núcleo, pero sin un patrón discernible de tinción nuclear.

Intensidad De La Fluorescencia

No se ha observado que la intensidad de la tinción tenga un valor clínico; sólo tiene un valor limitado como indicador del título. Para simplificar la interpretación, anote los resultados de la selección que sean muy positivos o muy negativos, y efectúe la titulación en consecuencia.

Es posible semicuantificar la intensidad de la fluorescencia con arreglo a las directrices sobre reactivos con anticuerpos fluorescentes establecidas por los Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (CDC).

- 4+ Verde manzana brillante (fluorescencia máxima): perfil celular claramente definido; centro celular claramente definido.
- 3+ Fluorescencia de color verde manzana menos brillante: perfil celular claramente definido; centro celular claramente definido.
- 2+ Patrón celular definido, pero fluorescencia tenue: perfil celular menos definido.
- 1+ Fluorescencia muy leve: perfil celular prácticamente indistinguible del centro celular en la mayor parte de los casos.

CAPÍTULO V
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

5. PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS.

5.1 Tabulación, Análisis e Interpretación de los datos.

Los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos durante la ejecución de la investigación que se llevó a cabo en los meses de marzo a junio de 2010, para comprobar la presencia de anticuerpos antinucleares; en la población que asisten al servicio de Reumatología de el Hospital Nacional Rosales de la Ciudad de San Salvador.

Para el análisis e interpretación de los resultados los datos se ordenaron en tablas de frecuencias donde se obtuvo el porcentaje de pacientes que presentaron sospecha de enfermedades autoinmunes; los datos estadísticos finales se obtuvieron mediante el programa de Procesador de Datos Estadísticos para las Ciencias Sociales (SPSS) 15 en español y Excel.

Además para obtener el porcentaje de casos positivos y negativos se realizó por medio de una tabla de frecuencias.

Por último las hipótesis fueron comprobadas utilizando la prueba estadística para poblaciones en el caso de muestras grandes iniciando con la determinación de las hipótesis en lenguaje estadístico seguido de la determinación del nivel de significancia de 0.05 y estadísticos de prueba para la población concluyendo con el rechazo de la hipótesis nula y aceptación de la hipótesis alterna.

Cuadro N° 1

Indicación por Género de Prueba de ANA realizadas a los Pacientes del servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.

SEXO DEL PACIENTE		
	Frecuencia	Porcentaje
Mujer	132	88%
Hombre	18	12%
Total	150	100%

Fuente: Resultados de pruebas de laboratorio

Análisis:

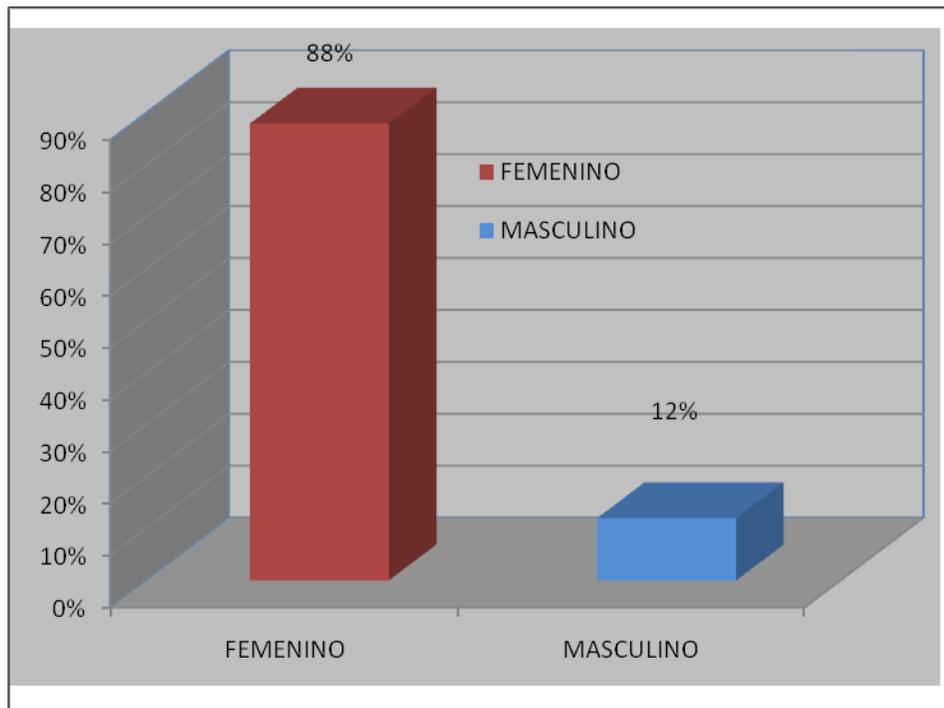
La población en estudio fué de 150 pacientes los cuales se dividen de la siguiente manera 132 corresponden a mujeres que representan el 88% y 18 hombres que es el 12% de la población total en estudio.

Interpretación:

La diferencia que existe entre la población masculina con la femenina es del 76% , debido a que las enfermedades autoinmunes atacan 3 veces más a las mujeres que a los hombres siendo considerado una de las principales causas de muerte o discapacidad para las mismas.

Gráfica N°1

Porcentaje de Indicación por Género de Prueba de ANA realizadas a los Pacientes del servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.



Fuente: Cuadro N° 1

Cuadro N° 2

Resultados Obtenidos de la Prueba de ANA Realizada a los Pacientes con sospecha de una Enfermedad Autoinmune en el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.

Resultados Obtenidos de la Prueba		
	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	49	32.7%
Negativo	101	67.3%
Total	150	100%

Fuente: Resultados de pruebas de laboratorio.

Análisis:

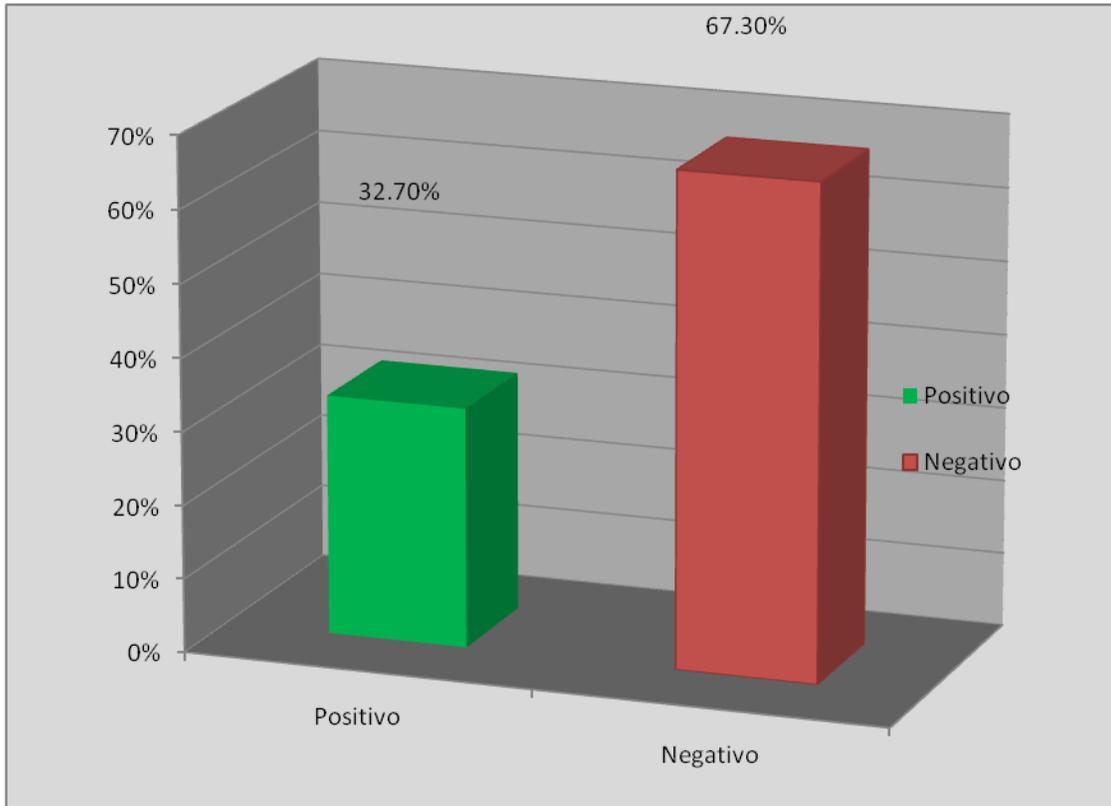
El cuadro N° 2 refleja el número de personas que presentaron sintomatología sugestiva a enfermedades autoinmunes y conforman el total de muestra que fue 150 personas de las cuales 49 fueron positivas a anticuerpos antinucleares que conforman un 33% y 101 negativos que corresponden a un 67.3% de la población muestreada.

Interpretación:

Menos de la tercera parte de la población en estudio es positivo a la presencia de anticuerpos antinucleares dirigidos contra diversas proteínas del núcleo celular los cuales podrían ser causa de autoinmunidad en los pacientes y con esto desarrollar una enfermedad autoinmune mientras que el resto de la población en estudio no presenta estos anticuerpos.

Gráfica N° 2

Porcentaje de Resultados Obtenidos de la Prueba de ANA Realizada a los Pacientes que se les sospecha una Enfermedad Autoinmune en el servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.



Fuente: Cuadro N° 2

Cuadro N°3

Resultado Positivos Obtenidos por Género de las Pruebas de ANA Realizadas a los pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.

Pruebas Positivas por Sexo		
	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	45	92.0%
Masculino	4	8.0%
Total	49	100%

Fuente: Resultados de pruebas de laboratorio.

Análisis:

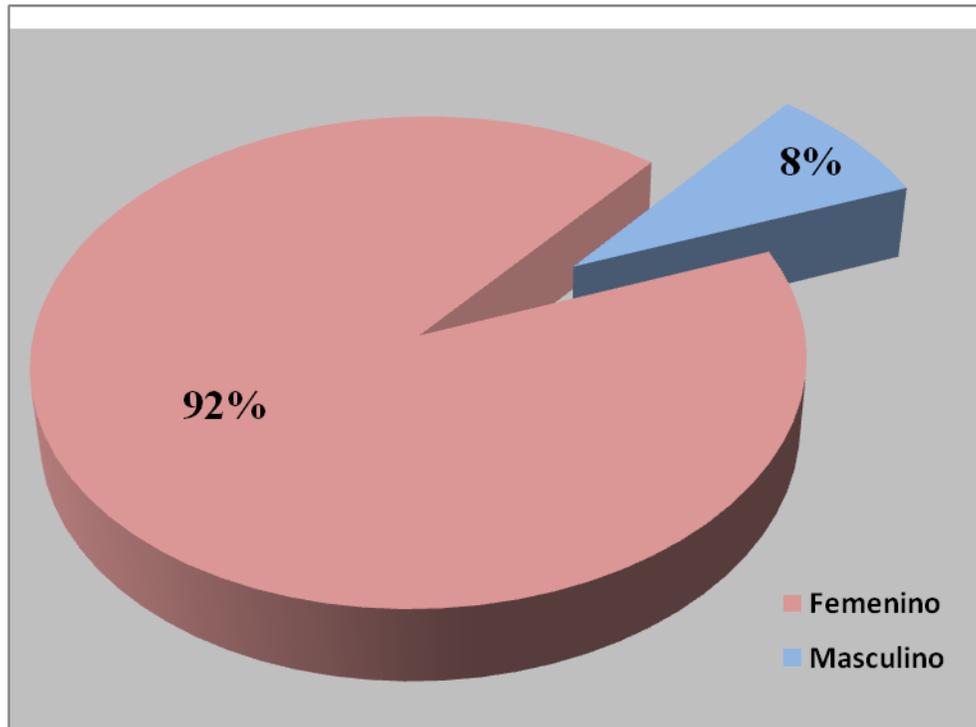
Según la distribución y porcentaje de los casos positivos a Anticuerpos Antinucleares basados en el sexo de la población se dividió en 2 grupos; el primer grupo está representado por 4 personas del sexo masculino que conforman el 8.0% y el segundo grupo representado por 45 personas del sexo femenino que constituye el 92.0% haciendo un total de 100% de casos positivos en la población estudiada.

Interpretación:

En el cuadro N° 3 puede apreciarse la diferencia significativa del número y porcentaje de casos positivos entre el sexo femenino y masculino, esto puede deberse a que las hormonas pueden tener un rol importante, debido a que la expresión de las enfermedades autoinmunes y sus síntomas parecen estar relacionados con los cambios en los niveles hormonales aunque existen otras causas como menopausia y factores genéticos que contribuyen al desarrollo de las enfermedades.

Gráfica N°3

Pocentaje de Resultados Positivos Obtenidos por Género de las Pruebas de ANA Realizadas a los pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.



Fuente: Cuadro N° 3

Cuadro N° 4

Patrones Observados al Microscopio de Fluorescencia en las Pruebas Positivas de ANA en los Pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.

Patrones Observados al Microscopio de Fluorescencia		
Patrón	Frecuencia	Porcentaje
Moteado Fino	25	51.0%
Moteado Grueso	3	6.1%
Centromérico	2	4.1%
Citoplasmático	2	4.1%
Nucleolar	4	8.2%
Mitocondrial	2	4.1%
Periférico	3	6.1%
Homogéneo	8	16.3%
Total	49	100%

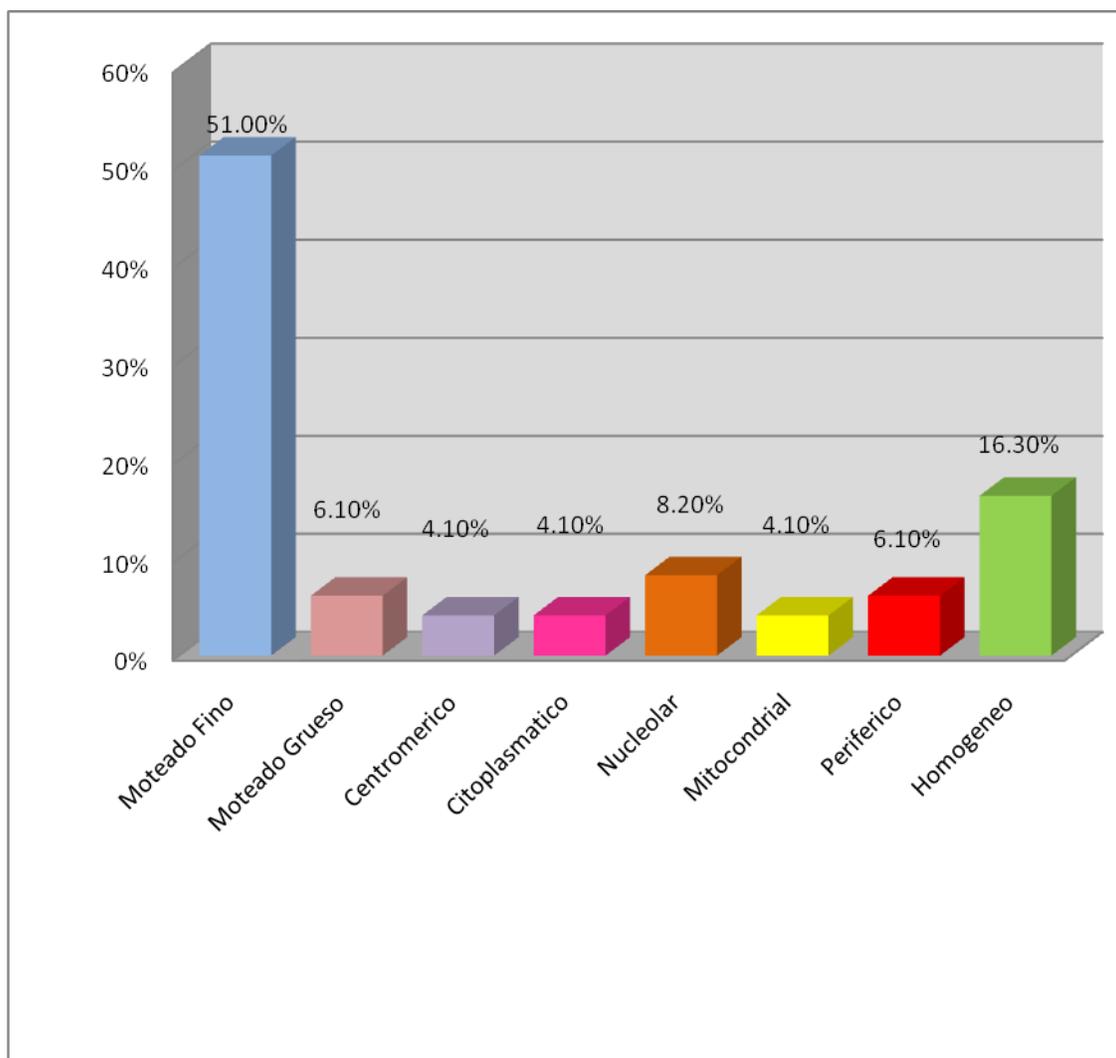
Fuente: Resultados de pruebas de laboratorio.

Análisis:

El cuadro N° 4 presenta las 49 pruebas positivas de las cuales se observó el Patrón Moteado fino se observó en 25 pacientes que representa el 51.0%, el Patrón Homógeneo con una frecuencia de 8 que equivale a 16.3% , el Patrón Nucleolar estuvo presente en 4 de las muestras analizadas que representa 6.1%, los Patrones Centromérico, Citoplasmático y Mitocondrial con una frecuencia de 2 que equivalen a 4.1% cada uno de ellos y los Patrones Moteado grueso y Periférico con una frecuencia de 3 que representan 6.1% cada uno de el 100% de las muestras que fueron analizadas.

Gráfica N°4

Porcentajes de Patrones Observados al Microscopio de Fluorescencia en las Pruebas Positivas de ANA en los Pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.



Fuente: Cuadro N°4

Cuadro N° 5

Patrones Observados al Microscopio de Fluorescencia por Género en las Pruebas Positivas de ANA en los Pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.

Patrón que se observa al Microscopio de Fluorescencia	Sexo del Paciente			
	Femenino		Masculino	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Moteado Fino	22	45.0%	3	6.1%
Moteado Grueso	3	6.1%	0	0.0%
Centromérico	2	4.1%	0	0.0%
Citoplasmático	2	4.1%	0	0.0%
Nucleolar	4	8.2%	0	0.0%
Mitocondrial	1	2.0%	1	2.0%
Periférico	3	6.1%	0	0.0%
Homogéneo	8	16.3%	0	0.0%

Fuente: Resultados de pruebas de laboratorio

Análisis:

El cuadro N° 5 se observan los resultados por género notándose que el Patrón predominante en ambos sexos fué el Moteado Fino de los cuales en el sexo femenino tuvo una frecuencia de 22 que representa un 45.0% y en el sexo masculino con una frecuencia de 3 que representa un 6.1%. El patrón Mitocondrial también presente en ambos sexos con una frecuencia de 1 que representa un 2.0% el resto de los patrones predominaron solo en el sexo femenino siguiendo un orden de descendente.

El patrón homogéneo cuenta con una frecuencia de 8 que representa el 16.3%, Nucleolar con una frecuencia de 4 que equivale a 8.2%, los patrones Moteado Grueso y Periférico con una frecuencia de cada uno de 3 que equivalen a 6.1%; por último los patrones Centromérico, Citoplasmático que presentaron una frecuencia de 2 que representan 4.1% cada uno de el 100% de las pruebas procesadas.

Interpretación:

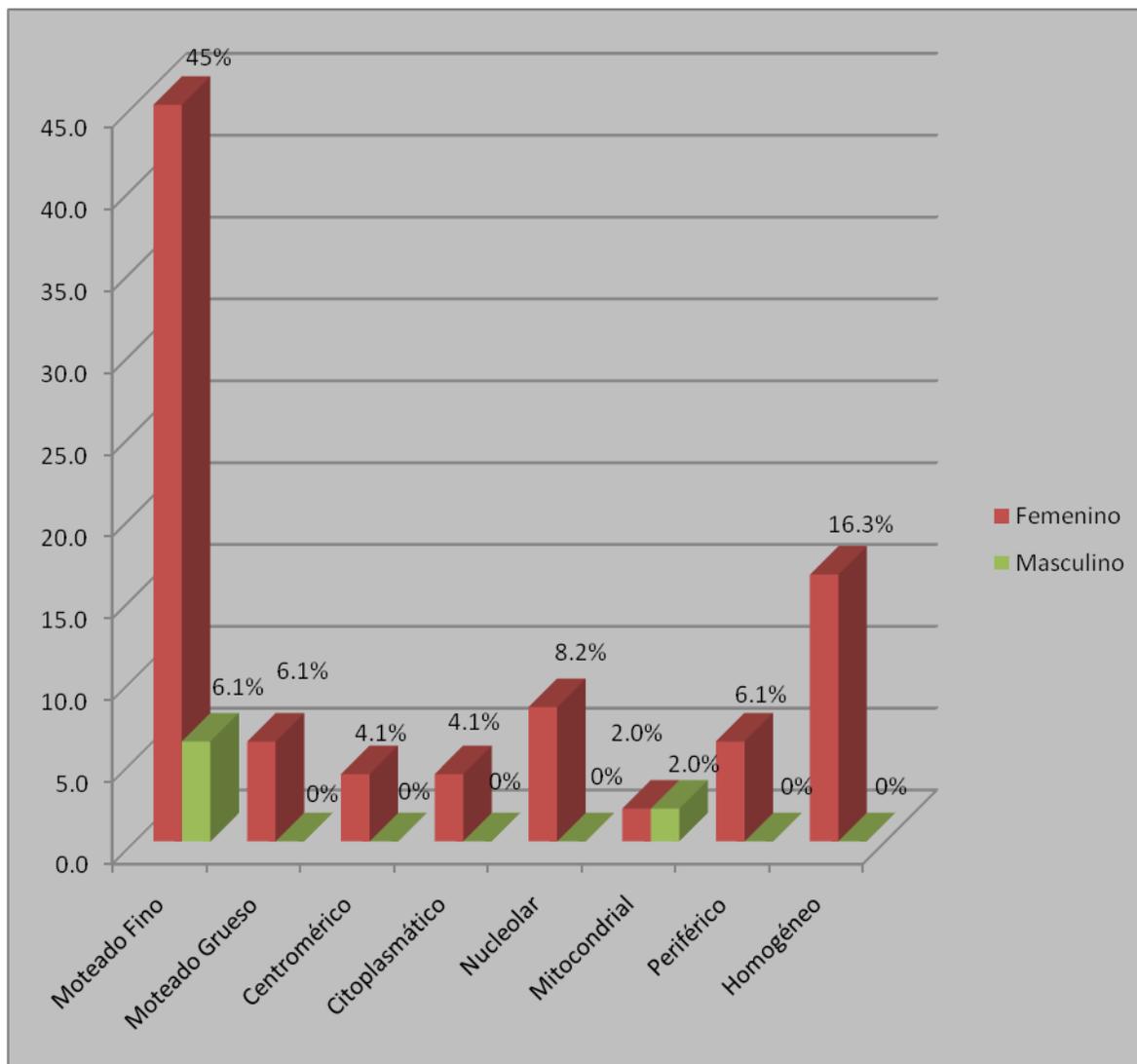
Con los resultados obtenidos se puede observar que el patrón Moteado Fino es el que predominó en nuestro estudio; en ambos sexos este patrón está asociado con el Síndrome de Crest, Lupus Eritematoso Sistémico en títulos altos y en títulos bajos a otras enfermedades del tejido conectivo correlacionando con la clínica que el médico evalúe.

El patrón Homogéneo en títulos elevados orienta a Lupus Eritematoso Sistémico. El patrón Nucleolar en títulos elevados está relacionado con Esclerodermia y Síndrome de Sjögren.

Todos estos patrones junto con los criterios clínicos y la exploración física del paciente pueden contribuir al médico para el diagnóstico de una Enfermedad Autoinmune.

Gráfica N°5

Patrones Observados al Microscopio de Fluorescencia por Género en las Pruebas Positivas de ANA en los Pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales de San Salvador.



Fuente: Cuadro N° 5

5.2 Prueba de Hipótesis para Proporción Poblacional.

Prueba Estadística en el Caso de Muestras Grandes.

La Hipótesis Nula (H_0) que se va a probar propone que el porcentaje de resultados positivos de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta es del 25% o menos, frente a la Hipótesis Alternativa (H_a) en la cual se plantea que el porcentaje de pruebas positivas es mayor del 25%. Así, la prueba de una cola incluye las dos Hipótesis siguientes:

$$H_0: p \leq 0.25$$

$$H_a: p > 0.25$$

La distribución muestral apropiada para proporciones de muestras grandes es la distribución normal. Elegimos un nivel de significancia del 5% para la prueba; esto significa que se está tomando una probabilidad del 5% de rechazar la Hipótesis nula considerada como cierta.

El estadístico de prueba para proporciones a usar es:

$$Z_c = \frac{p - P}{\sigma_p}$$

Dónde:

Z_c = Valor Calculado de Z.

p = Proporción Muestral de resultados positivos de las pruebas de ANA.

P = Proporción Poblacional de resultados positivos en las pruebas de ANA.

σ_p = Error Estándar de la Proporción en Estudio.

El error estándar de la proporción es:

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

Donde:

σ_p = Error Estándar de la proporción.

p = Proporción Muestral de Resultados Positivos.

q = Complemento de la Proporción.

Dónde: q = 1-p

n = Tamaño de la muestra.

La Proporción Muestral es:

$$p = \frac{x}{n}$$

p = Proporción Muestral.

x = Numero de Resultados Positivos en las Pruebas.

n = Tamaño de la Muestra.

Así:

La evidencia Muestral es:

n = 150

x = 49

$$p = \frac{x}{n}$$

$$= \frac{49}{150} = 0.327 \text{ es la proporción muestral}$$

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

$$q = 1 - 0.25 = 0.75$$

$$\sigma_p = \sqrt{\left(\frac{0.25 \times 0.75}{150}\right)}$$

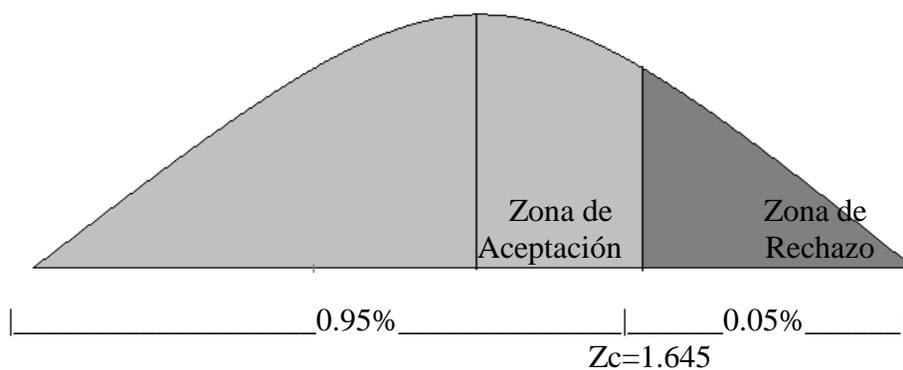
$$= 0.03535$$

Para:

$$Z_c = \frac{p - P}{\sigma_p}$$

$$= \frac{0.327 - 0.25}{0.03535} = 2.1782$$

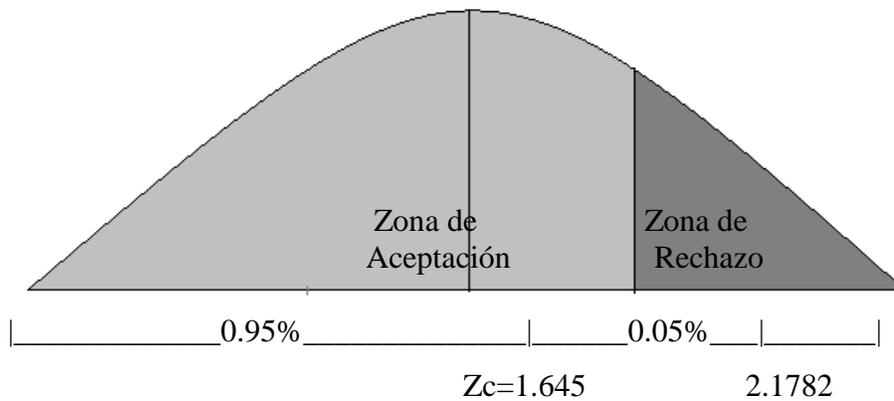
Como se trata de una prueba de una cola buscamos en la tabla de Área bajo la Curva Normal el valor de Z_c que es 1.645, la distribución muestra es:



La regla de decisión para esta prueba de Hipótesis es:

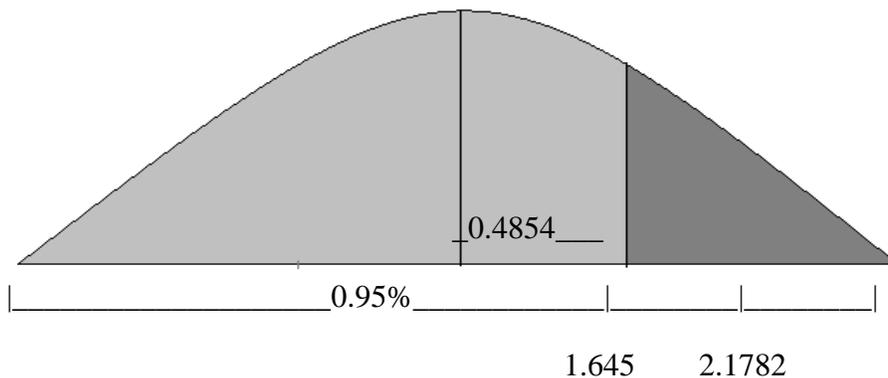
“Si la Proporción Muestral de resultados positivos es mayor que el Z crítico es igual a 1.645 y se rechaza la H_0 , si la proporción muestral que el Z crítico no se rechaza la Hipótesis nula”.

En conclusión como $Z_c = 2.1782$ es mayor que el Z crítico la Hipótesis nula se rechaza y se acepta la H_a (para nuestro estudio la H_a



Para reafirmar lo dicho anteriormente calculamos que porcentaje de la distribución muestral es mayor que el estadístico muestral de la curva, esto se muestra en términos mínimos de un Valor P, este valor se define como una probabilidad de observar un valor muestral tan extremo como, o más extremo que, el valor real observado, dado que la H_0 es cierta.

La probabilidad entre la proporción poblacional y la media del valor de $Z_c = 2.18$ que equivale a 0.4854, el Valor de P es el área de la derecha del valor de $Z = 0.5 - 0.4854 = 0.0146$.



La probabilidad de observar un valor Z mayor o igual que el 2.18 es solo 0.0146 si la H_0 es cierta, este Valor de P representa riesgo de rechazar la hipótesis nula cierta.

Si el Valor de $P < \alpha$ Se rechaza la hipótesis

Valor de $P \geq \alpha$ No se rechaza la hipótesis nula.

Como el Valor de P es menor que el nivel de significancia ($0.0146 < 0.05$) la hipótesis nula se rechaza, podemos concluir que el porcentaje de resultados positivos es mayor que el 25% la probabilidad de que esta conclusión este equivocada e de 0.0146 %.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6. Conclusiones y Recomendaciones.

6.1 Conclusiones:

Al desarrollar esta investigación se obtuvieron los siguientes resultados de los análisis de las muestras sanguíneas de los cuales se concluye:

- La prueba de ANA por Inmunofluorescencia Indirecta es sensible porque se detecta la presencia de anticuerpos en títulos bajos pero no específica debido a que estos anticuerpos pueden estar presentes en otras patologías no necesariamente de origen autoinmune.
- La presencia de Anticuerpos Antinucleares produce alteraciones en la célula lo cual puede llegar a originar una enfermedad autoinmune.
- Se confirmó la presencia de Anticuerpos Antinucleares en un 32.7% de las muestras analizadas de los pacientes a los cuales se les realizó la prueba durante el desarrollo de la presente investigación.
- Mediante la presente investigación se comprobó que de el total de pruebas positivas el 92% corresponde al el es el sexo femenino, género mayormente afectado debido cambios hormonales ya que estas sufren desequilibrios por el periodo menstrual u otros factores que contribuyen al desarrollo de una Enfermedad Autoinmune.
- Los patrones predominantes observados durante los análisis realizados a las muestras de los pacientes en estudio fueron: el Patrón Moteado Fino con un 51% este en títulos elevados puede orientar a LES, Síndrome de Sjögren, seguido del patrón Homogéneo con el 16.3% que en títulos elevados se relaciona con LES y patrón nucleolar con un 8.2% orienta a Esclerodermia.
- Por lo antes mencionado se acepta la hipótesis de investigación que dice "los pacientes que consultan el Servicio de Reumatología del Hospital Nacional Rosales tienen Alto porcentaje de positividad a la presencia de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.

6.2 Recomendaciones:

Al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social:

- Capacitar a todo el personal médico de primer, segundo y tercer nivel para reconocer los signos de sospecha característicos a una enfermedad autoinmune y el protocolo adecuado a seguir en estos casos.
- Implementar la realización de la prueba de detección de Anticuerpos Antinucleares a nivel de la red de nacional de salud pública.
- A través de sus entidades capacitar a más profesionales en Laboratorio Clínico en procesamiento y reporte de la prueba de detección de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.

Al Hospital Nacional Rosales

- Capacitar y actualizar más personal de salud sobre la toma y procesamiento de las muestras para la detección de anticuerpos antinucleares.
- Implementar la práctica de montaje y lectura de muestras de pacientes a los cuales se les realiza la prueba de detección de Anticuerpos Antinucleares en dicha institución y que los resultados sean entregados en el tiempo justo.
- Dar continuidad al estudio realizado, siguiendo los procesos de los pacientes que resultaron positivos a la prueba de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta con el objetivo de mejorar su situación de salud.
- Asignar un área adecuada para la realización de pruebas especiales que cuente con equipo, material y reactivo necesarios para la ejecución de tales pruebas.

Al Laboratorio Clínico Del Hospital Nacional Rosales:

- Renovar y ampliar en forma constante, los conocimientos relacionados con las técnicas y forma de reportar los resultados de la prueba de Anticuerpos Antinucleares por Inmunofluorescencia Indirecta.

A la población:

- Asistir periódicamente a los centros de salud para que las Enfermedades Autoinmunes sean detectadas con mayor prontitud para poder así indicar las pruebas clínicas que ayuden a dar un diagnóstico precoz de dicha patologías.

A los estudiantes de Licenciatura en Laboratorio Clínico:

- Adquirir conocimientos teóricos sobre actualizaciones relacionados con el tema en investigación
- Realizar estudios complementarios a la población dándole seguimiento al precedente, implementando técnicas innovadoras e interesantes para ofrecer un estudio más completo a los pacientes.

A la Universidad de El Salvador:

- Se recomienda realizar capacitaciones y seminarios que refuercen los conocimientos a los profesionales y estudiantes de la carrera de laboratorio clínico sobre las Enfermedades Autoinmunes y la realización de pruebas especiales como la detección de Anticuerpos Antinucleares que ayuden a proporcionar un diagnóstico precoz a los pacientes.

ANEXOS

ANEXO N°1

Cronograma de Actividades de la Carrera de Laboratorio Clínico Proceso de graduación Ciclo I y II-2010

ACTIVIDAD	MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Reunión general con la Coordinación	■	■	■	■																																				
Inscripción del Proceso					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								
Elaboración del Perfil de Investigación				■	■	■	■																																	
Entrega Del Perfil de Investigación																																								
Elaboración del Protocolo de Investigación									■	■	■	■	■	■	■																									
Entrega del Protocolo de Investigación																																								
Ejecución de la Investigación																	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
Tabulación análisis e interpretación de los datos																																								
Redacción del Informe Final																																								
Entrega del informe Final																																								
Exposición oral de los resultados																																								

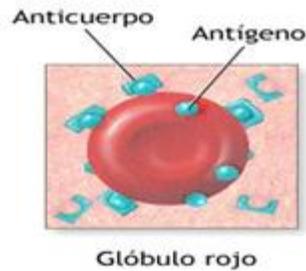
ANEXO N 2

Cronograma de Actividades Específicas de Marzo a Julio 2010

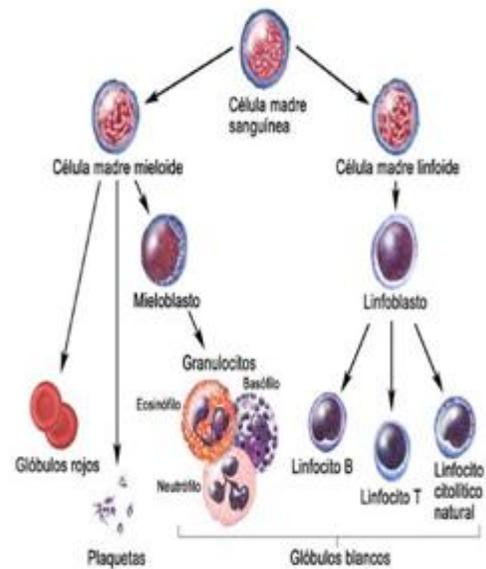
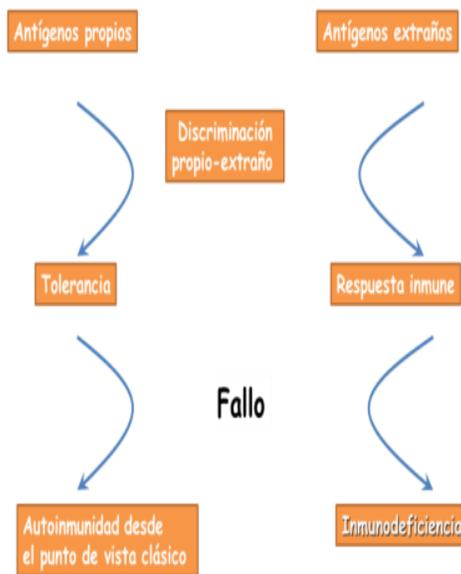
ACTIVIDAD	MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Coordinación con Dirección del Hospital y Jefatura del Laboratorio																				
Asesoría con Jefe de Área de Pruebas especiales																				
Coordinación con Doctores del área de Reumatología del Hospital																				
Capacitación sobre Técnica a utilizar en la Investigación																				
Primera toma de Muestras y Ejecución																				
Segunda toma de Muestras y Ejecución																				
Tercera toma de Muestras y Ejecución																				
Cuarta toma de Muestras y Ejecución																				
Quinta toma de Muestras y Ejecución																				
Sexta toma de Muestras y Ejecución																				
Séptima toma de Muestras y Ejecución																				
Tabulación de los Resultados Obtenidos																				

ANEXO N°3

Respuesta Inmune



Los anticuerpos son proteínas que el sistema inmunológico produce en respuesta a la presencia de un antígeno

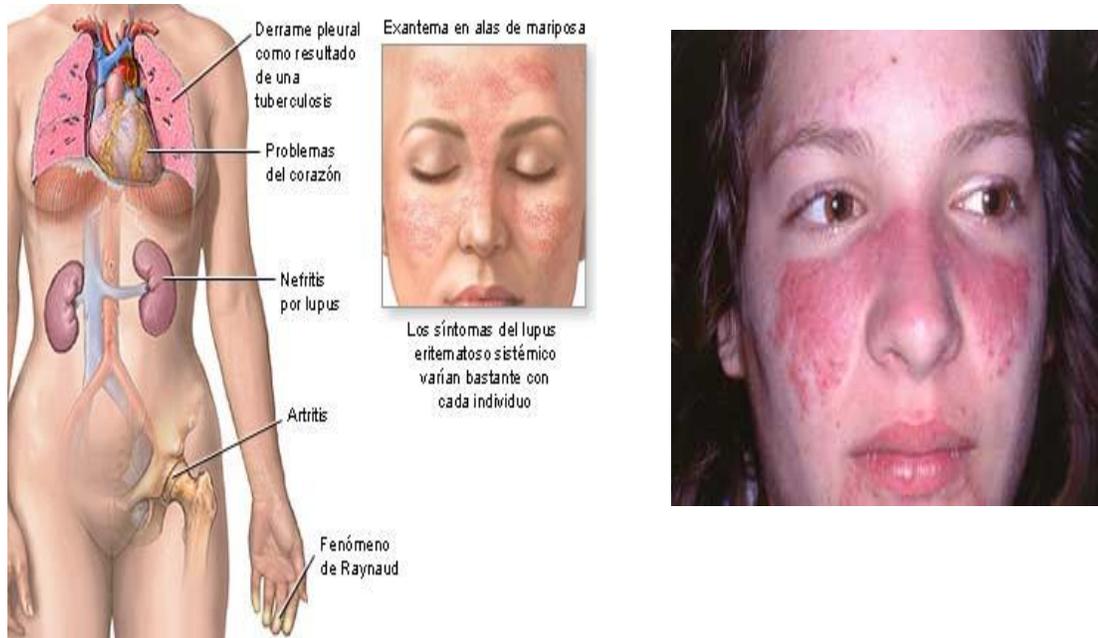


El sistema inmunológico está siempre alerta para detectar y atacar al agente infeccioso antes de que cause daño creando anticuerpos.

Cuando el sistema inmunológico no marcha adecuadamente, no puede distinguir a las células propias de las ajenas. En vez de luchar contra antígenos externos, las células del sistema inmunológico ó los anticuerpos que producen, pueden ir en contra de sus propias células y tejidos por error.

ANEXO N°4

Lupus Eritematoso Sisémico.

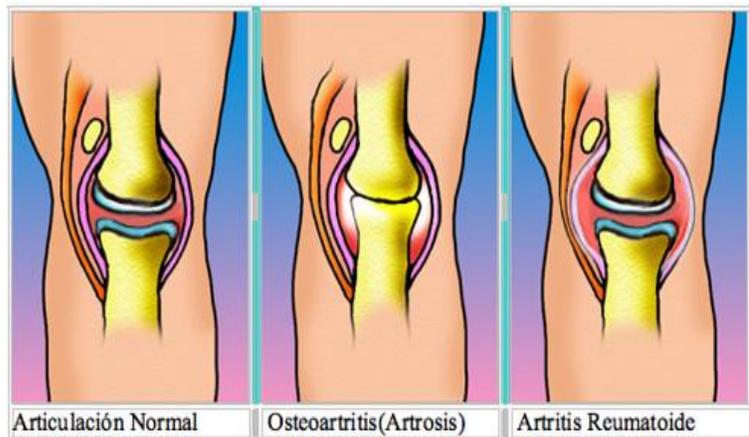


Los síntomas varían de una persona a otra y pueden aparecer y desaparecer. La enfermedad puede afectar primero a un órgano o a un sistema corporal y otros pueden resultar comprometidos posteriormente

Erupción cutánea, en forma de "mariposa" en las mejillas y el puente nasal que afecta a aproximadamente la mitad de las personas con LES. La erupción empeora con la luz solar y también puede ser generalizada.

ANEXO N°5

Artritis Reumatoide



La artritis reumatoide generalmente afecta a las articulaciones de ambos lados del cuerpo por igual, siendo las muñecas, los dedos de las manos, las rodillas, los pies y tobillos las partes del cuerpo más comúnmente afectadas.

ANEXO N° 6

Síndrome De Sjögren



Sequedad en la boca: La afección de las glándulas salivales produce su mal funcionamiento y por lo tanto la falta de producción de saliva. El paciente siempre se queja de que tiene la boca seca y mucha dificultad al tragar. Lo más habitual es que tenga que ingerir abundante agua durante las comidas. En algunos casos pacientes han llegado incluso a perder el sentido del gusto.

ANEXO N° 7

Esclerosis Sistémica

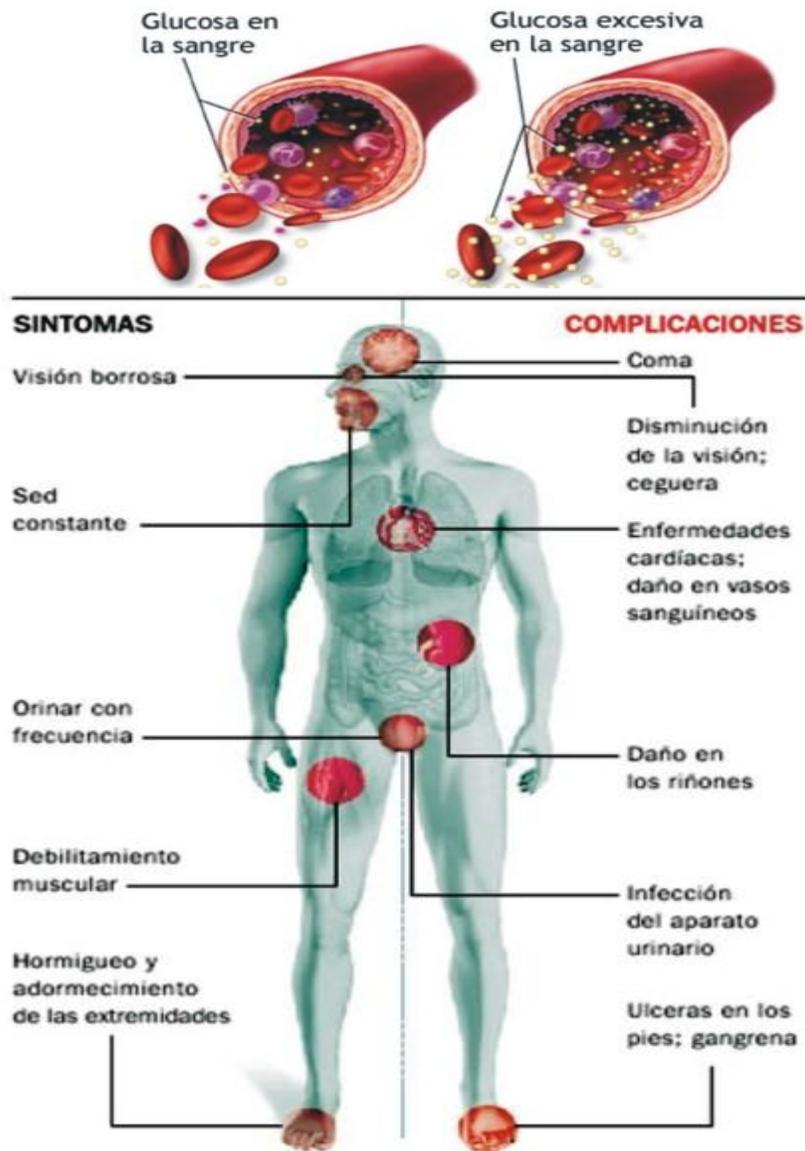


Caracterizada por afectación cutánea inicial generalizada con rápida progresión y afectación visceral temprana. El Fenómeno de Raynaud puede presentarse aisladamente muchos años antes de la afectación de la piel.

ANEXO N° 8

Diabetes Mellitus Tipo I

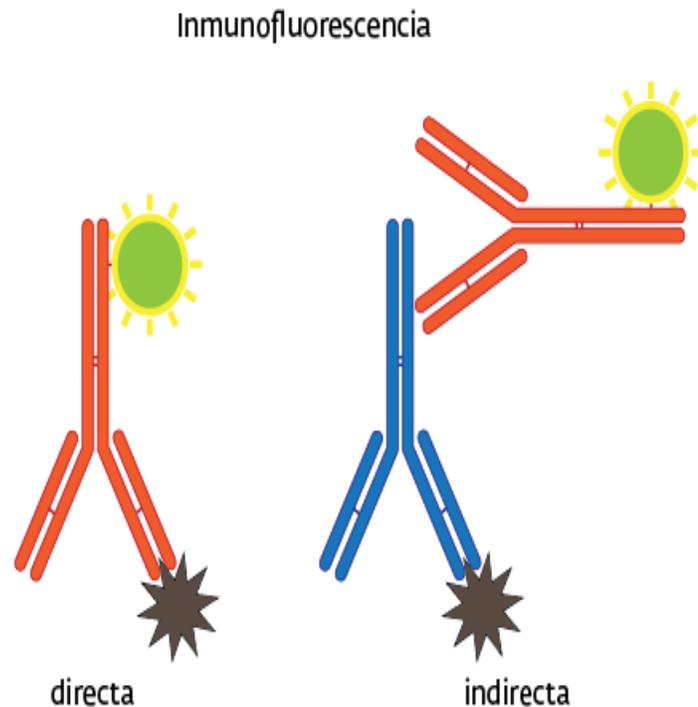
La meta es mantener los niveles normales de glucosa en la sangre



Se debe a la destrucción progresiva de las células del páncreas, que son las que producen insulina. Ésta tiene que administrarse artificialmente desde el principio de la

enfermedad. Sus síntomas particulares son el aumento de la necesidad de beber y de la cantidad de orina, la sensación de cansancio y la pérdida de peso.

ANEXO N°9



La inmunofluorescencia (IF): Se divide en Inmunofluorescencia indirecta la permite la detección de **anticuerpos circulantes** y la IF directa permite la detección de **antígenos** en un paso. Utiliza anticuerpos conjugados a **isotiocianato de fluoresceína**. La lectura se realiza en un microscopio de fluorescencia, que emite luz ultravioleta de una determinada longitud de onda.

ANEXO N° 10

Toma De Muestras Para IFI.



Pacientes en área de espera de toma de muestras



Toma de muestra de los pacientes.

ANEXO N° 11

Procedimiento De Inmunofluorescencia Indirecta.

Buffer PDF



Solución diluyente



1-Medir 395µl de solución diluyente para cada prueba a realizar.



2- Medir 5µl de muestra del paciente.



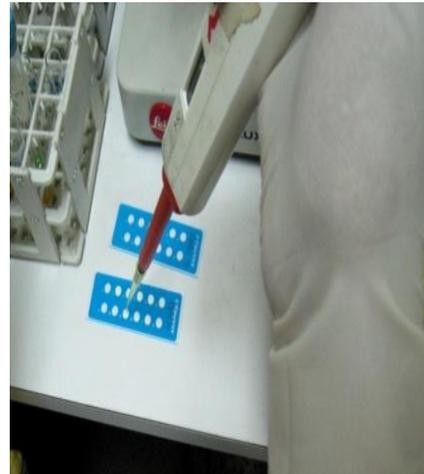
3- Agregar la muestra a la solución diluyente.



4- Agregar 1 gota l de control positivo y negativo.



5- Colocar las diluciones en orden correspondientes.



6-Incubar por 30 minutos las placas.



7-Lavar el exceso de dilución utilizando Buffer PDF



8- Lavar con solución en Jarra de Coplín rotando 10 min.



9- Secar cada una de las láminas.



10- Agregar 1 gota de solución de contraste.



11- Incubar por 30 minutos con la solución de contraste.



12- Lavar el exceso de colorante de contraste.



13-Agregar solución de montaje



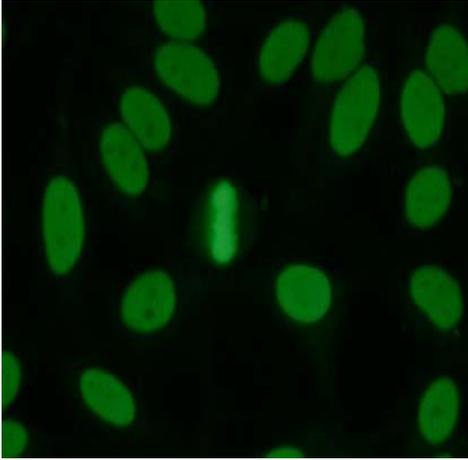
14- Observar al microscopio de fluorescencia para la identificación de los patrones.



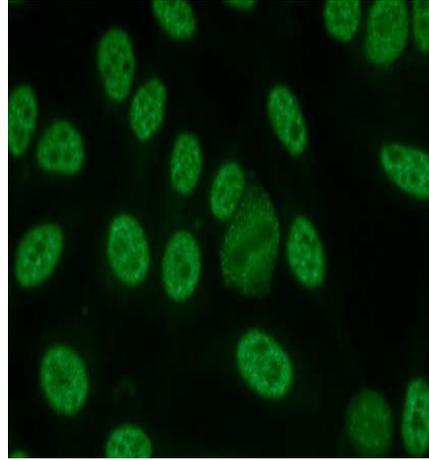
ANEXO N°12

Patrones de Tinción Observados.

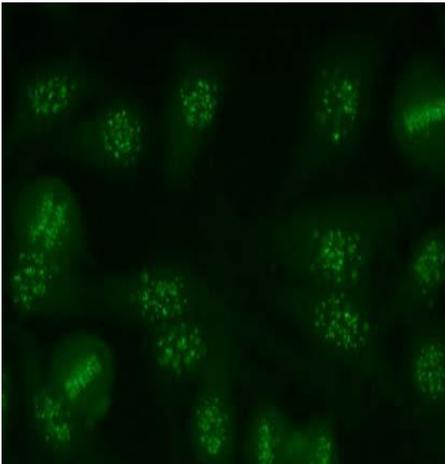
Homógeneo



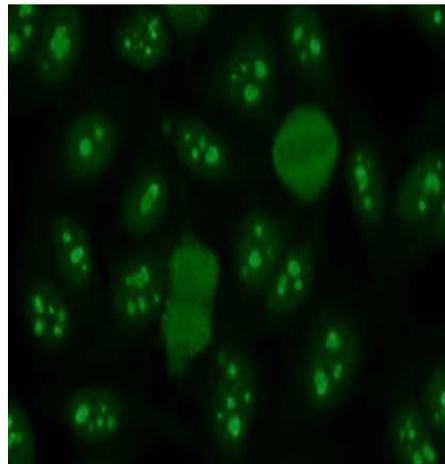
Moteado



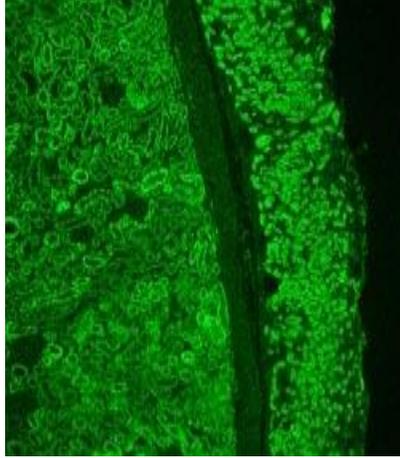
Nucleolar



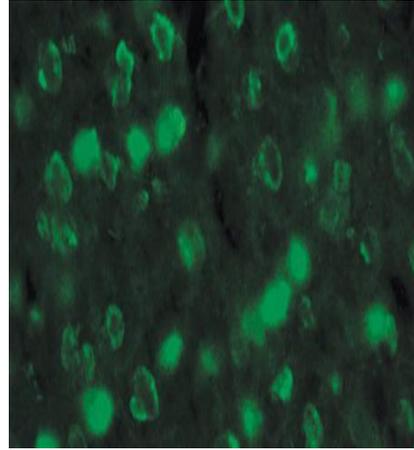
Centrómero



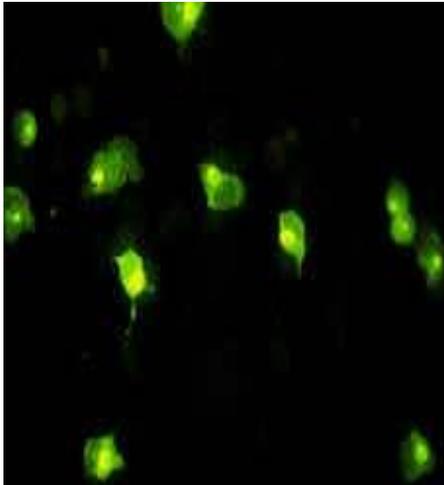
Mitocondrial



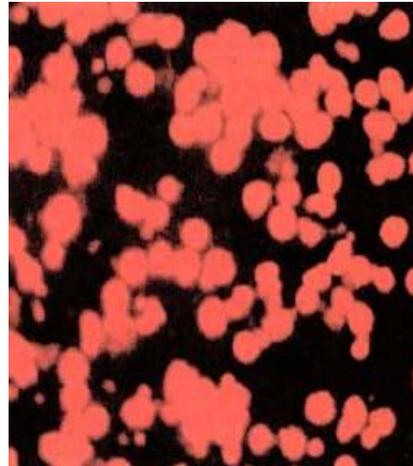
Periférico



Citoplasmático



Reaccion negativa.



Referencias Bibliográficas

Libros:

1. Ferri Fredf, Harcourt CLINICA FERRI Edición 2006, Pag 334-335,452,50-51
© 2002, Asociación Colombiana de Reumatología.
Científica. Centro de investigación y Estudios de Salud. 4ª. Edición. Managua,
2. Gamarra Antonio Iglesias & Cols. Revista Colombiana De Reumatología.
HARRISON Principios de Medicina Interna 16ª Edición. Dennis L Kasper ,MO Eugene
Beunwald, MD PAG 2154-2193.
Investigación y Elaboración). El Salvador, 2001. 72 Págs.
3. LOPEZ PIURA, Julio. Introducción a la Metodología de la Investigación
Metodológica para la elaboración de protocolo de investigación.UEI.
4. MONTOYA William Rojas, COLAB. Caña R Corporación para la Investigación
Bilógica Inmunología 12 Edición., PAG, 322-335.
5. Nicaragua.2000. 185 Págs.
Publicación digital de la 1ra Cátedra de Clínica Médica y Terapéutica y la Carrera de
Posgrado de especialización en Clínica Médica Facultad de Ciencias Médicas -
Universidad Nacional de Rosario, Rosario - Santa Fe - República Argentina pag., 1-7
Revista Colombiana De Reumatología VOL. 9 No. 4, Diciembre 2002, pp. 288-311

Direcciones electrónicas.

- <http://www.medicina21.com/doc.php?apartat=Dossier&id=98>
- http://www.espondilitis.eu/Enfermedades_Autoinmunes.html
- <http://www.faba.org.ar/fabainforma/357/acta01.html>
- http://ecodiario.eleconomista.es/salud/noticias/611945/06/08/La_SEMI_proyecta-la-creacion-de-un-directorio-de-enfermedades-autoinmunes-para-mejorar-su-diagnostico.html
- http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas_nuevos_pdf/tema19.pdf
- http://www.sierrasolidaria.org/patologias/enfermedades_autoinmunes/documentos/Enfermedades-Autoinmunes.pdf
- <http://escuela.med.puc.cl/publ/apuntesreumatologia/pdf/usolaboratorio.pdf>