

302827¹¹



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con estudios incorporados a la U.N.A.M.

**ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-DNA_n POR
LA TECNICA DE AARDEN (*Critidia luciliae*) EN
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

MONICA LORENZO GASSOS

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del Problema	1
1.2. Objetivos	2
1.3. Hipótesis	3
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Generalidades	4
2.1.1. Etiología	5
a) Predisposición Genética	5
b) Factores Inmunológicos	5
c) Factores Hormonales	6
d) Fármacos	6
e) Agentes Infecciosos	7
f) Factores Ambientales	7
2.1.2. Inmunopatogenia	7
2.1.3. Manifestaciones Clínicas	9
a) Manifestaciones Cutáneas	9
b) Manifestaciones Articulares	9
c) Manifestaciones Cardíacas	10
d) Manifestaciones Pulmonares	10
e) Manifestaciones Renales	10
f) Manifestaciones del Tracto Gastrointestinal	11

g) Manifestaciones Hepáticas	11
h) Manifestaciones del Sistema Nervioso Central	11
2.1.4. Autoanticuerpos	11
a) Autoanticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares	12
b) Autoanticuerpos dirigidos contra antígenos citoplasmáticos	12
2.1.4.1. Autoanticuerpos Específicos	12
a) Anticuerpo a DNA nativo (anti-DNA)	12
b) Anticuerpos contra desoxinucleoproteína forma soluble (anti-DNP)	14
c) Anticuerpos contra el antígeno Smith (anti-Sm)	14
d) Anticuerpos a Ma	14
2.1.5. Diagnóstico	14
2.1.6. Tratamiento	15
2.1.6.1. Terapia inmunosupresora	16
2.2. Determinación de anti-DNA por el Método de Inmunofluorescencia	
Indirecta usando como sustrato antigénico <i>Crithidia luciliae</i>	16
2.2.1. Antecedentes	16
a) Método de Farr	16
b) Método de Precipitación con Polietilén Glicol (PEG)	17
2.2.2. Inmunofluorescencia Indirecta con <i>Crithidia luciliae</i> como sub-	
strato antigénico	17
a) Generalidades	17
 III. PARTE EXPERIMENTAL	 18
3.1. Diagrama de Flujo	18
3.2. Material, Reactivos y Equipo	19
3.2.1. Material biológico	19
3.2.1.1. Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Crithidia luciliae</i>	19
3.2.1.2. Sueros humanos	19
3.2.2. Material de laboratorio	19

3.2.3. Reactivos	20
3.2.4. Preparación de Reactivos	21
3.3. Metodología	25
3.3.1. Inmunofluorescencia Indirecta	25
Preparación del Antígeno	25
Dilución del Conjugado	25
Dilución del Azul de Evans	26
Dilución de los Sueros	26
Técnica	26
Interpretación de Resultados	27
3.3.2. ELISA	27
Preparación del Antígeno	27
Técnica	28
3.4. Análisis Estadístico	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	30
4.1. Resultados	30
a) Determinación de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG por el método de Inmunofluorescencia Indirecta usando como sustrato antigénico cinetoplasto de <i>Crithidia luciliae</i> (IFI/ <i>Crithidia luciliae</i>)	30
b) Determinación de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG por el método de Inmunofluorescencia Indirecta usando cinetoplasto de <i>Trypanosoma cruzi</i> como sustrato antigénico (IFI/ <i>T. cruzi</i>)	30
c) Determinación de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG por la técnica de ELISA usando antígeno soluble de <i>Crithidia luciliae</i> (ELISA/C. <i>luciliae</i>)	31
d) Determinación de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG por la técnica de ELISA empleando antígeno soluble de <i>Trypanosoma cruzi</i> (ELISA/ <i>T. cruzi</i>)	31
e) Sensibilidad y especificidad de la técnica de IFI/ <i>Crithidia luciliae</i> para la detección de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG en sueros de pacientes con LES	32
f) Sensibilidad y especificidad de la técnica de IFI/ <i>Trypanosoma cruzi</i> para la detección de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG en sueros de pacientes con LES	33

g) Sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA/ <i>Crithidia lucillae</i> para la detección de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG en sueros de pacientes con LES	34
h) Sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA/ <i>Trypanosoma cruzi</i> para la detección de anticuerpos anti-DNA _n isotipo IgG en sueros de pacientes con LES	35
4.2. Discusión	39
V. CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFIA	41

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del Problema

El lupus eritematoso sistémico (LES), prototipo de enfermedad autoinmune no órgano específica, está caracterizado clínicamente por la producción de anticuerpos dirigidos contra constituyentes nucleares como DNA, RNA y complejos de nucleoproteínas; elementos formes de la sangre, factores de la coagulación, glicoesfingolípidos de la membrana celular, gamma-globulina autóloga (factor reumatoide), así como por la presencia de hipergammaglobulinemia, anomalidades en los linfocitos T supresores, menores niveles de complemento en suero y niveles mayores de complejos circulantes (17, 29).

El anticuerpo contra DNA nativo o DNA de doble cadena (DNAn o DNAdc) isotipo IgG se considera específico del lupus eritematoso sistémico, detectándose con frecuencia del 75-95% en pacientes no tratados con la enfermedad en fase activa. Presenta correlación clínico-patológica. Está ligado a compromiso renal y/o cerebral y por tanto a una morbiletalidad significativa. Además de poseer un significado diagnóstico, está considerado como útil para evaluar el pronóstico de la enfermedad, una exacerbación está precedida por un aumento en los niveles de anticuerpo, mientras que un decremento en los niveles de anticuerpo indica un mejoramiento de la situación clínica (11, 26).

Un método usado para demostrar el anticuerpo contra DNA nativo utiliza como sustrato antigénico a *Crithidia luciliae*, un parásito hemoflagelado de aves, no patógeno para el hombre, que posee una mitocondria modificada, el cinetoplasto, de gran tamaño, que está formada por DNA circular (DNAc) que fija al anticuerpo con eficiencia (1,2).

El método de inmunofluorescencia usando como sustrato antigénico a *Crithidia luciliae* para detectar anticuerpo contra DNAn, se emplea ampliamente para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico.

Debido a la estrecha relación filogenética de *Crithidia luciliae* con el también protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cual tiene una amplia distribución geográfica en México (34), se desea verificar si el suero que reconoce epitopos en el microorganismo *Trypanosoma cruzi*, incluye anticuerpos reactivos contra cinetoplasto, y si esto puede producir reacciones falsas positivas en el método diagnóstico utilizado en el laboratorio para demostrar autoanticuerpos anti-DNAn.

1.2. Objetivos

1. Adaptar a las condiciones del laboratorio el método de inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato antigénico cinetoplasto de *Crithidia luciliae* para detectar anticuerpos anti-DNAn.
2. Conocer su especificidad en pacientes con lupus eritematoso sistémico, otras enfermedades reumáticas, cardiopatía chagásica crónica y en sujetos normales.

1.3. Hipótesis

Aunque *Crithidia luciliae* y *Trypanosoma cruzi* son protozoarios hemoflagelados con cercanía biológica, si en el lupus eritematoso sistémico hay respuesta autoinmune selectiva a DNAn y en la enfermedad de Chagas no hay anticuerpos anti-DNAn sino a otros epitopos presentes solo en el *Trypanosoma cruzi*, entonces no habrá reacción cruzada durante el diagnóstico serológico de autoanticuerpos anti-DNAn.

CAPITULO II ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad generalizada, crónica, con exacerbaciones agudas de curso y gravedad variable, que afecta cualquier órgano, aparato y/o sistema, donde produce lesiones principalmente por vasculitis en vasos menores. Estas lesiones muestran depósitos de complejos inmunitarios, característica esta que, asociada a la presencia de múltiples autoanticuerpos contra componentes celulares y proteínas del plasma, han dado base para clasificar al LES como una enfermedad autoinmune, prototipo de la enfermedad por complejos inmunitarios en el humano (17, 28).

Inmunológicamente el lupus eritematoso sistémico se caracteriza por la producción de una gran variedad de autoanticuerpos, la cual no existe en ninguna otra condición clínica. Los autoanticuerpos presentes en sueros de pacientes con LES están dirigidos contra elementos formes de la sangre, factores de la coagulación, glicoesfingolípidos de la membrana celular, gamma-globulina autóloga (factor reumatoide) y contra macromoléculas del núcleo como DNA, RNA y complejos de nucleoproteínas (19, 28).

El lupus eritematoso sistémico se presenta en todas las razas, tal vez con mayor frecuencia en la raza negra, aunque también son susceptibles las poblaciones de origen español y asiático. Tiene predilección por mujeres en edad de procreación, con una frecuencia ocho veces mayor que en los hombres, no obstante el LES también afecta a niños, varones y ancianos (21, 24).

2.1.1. Etiología

La etiología del lupus eritematoso sistémico no está aún bien esclarecida. Se considera una enfermedad de causa multifactorial. Entre los factores involucrados se encuentran factores genéticos, inmunológicos, hormonales y ambientales, los cuales participan en la expresión de la enfermedad para cada paciente, siendo variable su contribución relativa en un paciente dado.

a) Predisposición Genética

La predisposición genética es denominada "diátesis lúpica". Está basada en el hecho de que el lupus eritematoso sistémico se ha reportado en gemelos monocigotos en un 70%, pero no en dicigotos, y se han descrito casos familiares con una frecuencia del 10% de pacientes que poseen una o varias personas afectadas en su familia. Además, existe una asociación entre LES y el antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), el haplotipo que se ha asociado con LES es HLA A1, B8, DR2 ó DR3. Se asegura que la enfermedad está relacionada con deficiencia hereditaria del complemento, particularmente C4, C2, C1, C5, C8 y el inhibidor de C1 esterasa. La reducción genéticamente determinada del receptor para C3b/C4b, llamado CR-1, se ha demostrado en el LES. Puede relacionarse con incapacidad para aclarar complejos inmunitarios, favoreciendo en forma indirecta su depósito en la microcirculación, ya que son eliminados más lentamente de lo normal (5, 21, 31).

b) Factores Inmunológicos

La aberración inmunológica se presenta tanto en la inmunidad celular como en la humoral. Existe una disminución de los linfocitos T supresores y en el factor tímico, y un aumento en la capacidad de los linfocitos B para proliferar y producir anticuerpos y por ende se presenta hipergammaglobulinemia y formación de autoanticuerpos, incluyendo los anticuerpos linfocitotóxicos. Cuando el LES se encuentra en fase activa, disminuye el número de linfocitos T ayudadores/inductores y supresores/citotóxicos, y muchas funciones son anormales, incluidas su

capacidad de participar en la citotoxicidad directa y mediada por anticuerpos. La capacidad de los linfocitos T para secretar interleucinas queda suprimida, y los macrófagos producen formas anormales de interferón. La imposibilidad de suprimir anticuerpos también es consecuencia de anomalías en la red idiotipo-antiidiotipo humoral (6, 18, 25, 30, 32).

c) Factores Hormonales

Las hormonas sexuales influyen y contribuyen en la patogenia del lupus eritematoso sistémico. Los estrógenos favorecen la presencia del LES, esto ha sido comprobado por la creación de un ambiente artificial en animales de experimentación castrados. Por otro lado, los andrógenos (testosterona) desempeñan un papel protector, aplacando las respuestas de los anticuerpos. Hombres y mujeres lúpicas tienen una mayor hidroxilación de estrógeno y estrona a 16 α -hidroxiestrona, con lo cual surge una prolongación estrogénica (21).

d) Fármacos

Existen algunos fármacos como la hidralacina, procainamida y algunos anticonvulsivantes que son capaces de inducir lupus eritematoso sistémico después de un empleo prolongado. Al parecer los individuos acetiladores lentos tienen mayor predisposición a desarrollar LES por fármacos. Estudios recientes indican que medicamentos como la hidralacina y procainamida, que son capaces de inducir LES, pueden causar una hipometilación del DNA, la cual, hipotéticamente, puede deberse al resultado de un decremento en la actividad de la DNAmetiltransferasa. Lo anterior se relaciona ampliamente con los trabajos de Richardson y colaboradores, quienes encontraron que el DNA de los linfocitos T de pacientes con LES está menos metilado que el DNA de los linfocitos T de sujetos normales (22, 32).

e) Agentes Infecciosos

Durante muchos años se ha discutido el papel de un agente infeccioso, posiblemente un virus, en la etiología del lupus eritematoso sistémico. Este factor está apoyado en la evidencia de enfermedades similares al LES producidas por virus en animales como el visón aleutiano y el ratón híbrido de Nueva Zelanda (NZB/NZW). Así como la identificación de estructuras tubulares semejantes a mixovirus en el endotelio vascular de infiltrados dérmicos en piel lesionada y glomérulo. Los fosfolípidos en las paredes de las bacterias intestinales pueden actuar como activadores de linfocitos B policlonales o antígenos que desencadenen la producción de anticuerpos que muestran reactividad cruzada con el esqueleto del fosfato de ribosa en el DNA (9, 22, 35).

f) Factores Ambientales

En el individuo genéticamente susceptible, la radiación UV puede precipitar o exacerbar el curso del lupus eritematoso sistémico, quizá al alterar la antigenicidad del DNA, o por la composición de las uniones dermoepidérmicas. Se han evidenciado anticuerpos a radiación UV-DNA desnaturalizado (RUV-DNA_d). La ingestión de un aminoácido vegetal, la l-canavanina, presente en la alfalfa, se ha asociado al desarrollo de un cuadro similar a LES y a exacerbaciones de la enfermedad (33).

2.1.2. Inmunopatogenia

Las anomalías básicas del lupus eritematoso sistémico comprenden la producción de anticuerpos en complejos inmunitarios patógenos. No todos los anticuerpos *per se* o los complejos inmunitarios son patógenos. Algunos autoanticuerpos, como los producidos contra los

antígenos de superficie de eritrocitos o los factores de la coagulación, causan la enfermedad por su especificidad por el antígeno; otros son patógenos por su capacidad de fijar complemento, isotipo de inmunoglobulina, avidéz por tejidos, carga eléctrica o todos los factores en conjunto.

Al parecer, el daño tisular en pacientes con LES está mediado por complejos inmunes antígeno-anticuerpo fijadores del complemento. La formación de complejos inmunes puede ser *in situ* o por la interacción del antígeno y anticuerpo en sangre. Se ha demostrado su participación en trastornos como glomerulonefritis, vasculitis, serositis, alteraciones cutáneas y neumonitis. Las lesiones eritematosas o discoides han sido asociadas a los complejos inmunes. Las alteraciones en sistema nervioso central pueden deberse también a complejos inmunes (12, 15, 28).

Se cree que la activación de la vía clásica del complemento es un prerequisite para la expresión del daño tisular inducido por los complejos inmunes. El complejo inmune DNA-antiDNA es capaz de activar el complemento. Además se han encontrado crioglobulinas circulantes, posiblemente complejos inmunes, capaces así mismo de activar el complemento por la vía clásica. La vía alternativa también es activada en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Un factor indistinguible del factor iniciador (FI) y el complejo macromolecular (19S) que se han aislado en pacientes con LES, activan también la vía alternativa del complemento (15, 19).

Entre los factores que determinan la citotoxicidad potencial de los complejos inmunes antígeno-anticuerpo circulantes o los formados localmente están: el tamaño molecular, la relación antígeno/anticuerpo, la habilidad para fijar complemento y el aclaramiento de los complejos inmunes por el sistema macrofágico (28).

Por otro lado, intervienen también en la patogénesis del lupus eritematoso sistémico los anticuerpos citotóxicos. Estos anticuerpos actúan contra antígenos de membrana *in situ*, como los anticuerpos antieritrocito, anticuerpos antilinfocito y anticuerpos antiplaquetas, asociados a anemia hemolítica, linfopenia y trombocitopenia (12).

2.1.3. Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas del lupus eritematoso sistémico dependen de las subpoblaciones de complejos y anticuerpos que están en el "repertorio" del organismo, órganos, células o productos celulares que constituyen los "blancos", y el hecho que el individuo posea la capacidad de corregir y anular dichas anormalidades.

En el inicio de la enfermedad, se puede ver afectado sólo un órgano o sistema y generalizarse posteriormente, o afectar múltiples órganos. Los síntomas sistémicos son notables e incluyen fatiga, malestar general, fiebre, anorexia, pérdida ponderal y náuseas.

a) Manifestaciones Cutáneas

Las manifestaciones cutáneas incluyen el eritema malar en alas de mariposa, presente aproximadamente en el 20% de los pacientes lúpicos, este eritema suele ser exacerbado por la luz ultravioleta. Se presenta alopecia difusa durante la fase activa. Dentro de las lesiones cutáneas vasculíticas se presentan nódulos subcutáneos, úlceras, principalmente en piernas, boca y labios e infartos de piel y dedos (10, 22).

b) Manifestaciones Articulares

Las manifestaciones articulares están presentes en el 90% de los casos. Las más comunes son artralgias y mialgias, aunque en muchos pacientes se observa artritis. Pueden verse involucrados codos, hombros, pies, las articulaciones interfalángicas y metacarpofalángicas de manos, muñecas y rodillas, y la articulación temporomandibular (22).

c) Manifestaciones Cardíacas

El dolor pericárdico es el síntoma más frecuente de afección cardíaca en el lupus eritematoso sistémico (22).

d) Manifestaciones Pulmonares

La alteración pulmonar más frecuente en pacientes con lupus eritematoso sistémico es la pleuresía transitoria. Pueden presentarse derrames hemorrágicos que conllevan a endurecimiento pleural. Una manifestación inicial puede ser neumonitis aguda con episodios repetitivos de fiebre, disnea y tos. Con una frecuencia muy pequeña se ha presentado neumonitis intersticial, que ocasiona fibrosis (22).

e) Manifestaciones Renales

Los cambios renales son de gran importancia para determinar el pronóstico del lupus eritematoso sistémico. Las alteraciones renales están asociadas a títulos altos de anticuerpos antinucleares (ANA), anti-DNAe e hipocomplementemia. El daño renal aparece generalmente al inicio de la enfermedad y es más frecuente y severo en pacientes jóvenes. En el inicio de la enfermedad puede existir uremia, hematuria, cilindruuria y proteinuria. Entre quienes sufren lesiones más graves, activas o crónicas, una causa importante de muerte es la insuficiencia renal. Casi todos los enfermos de lupus eritematoso sistémico tienen depósitos de inmunoglobulina en glomerulos, pero solo el 50% presentan nefritis clínica definitiva por proteinuria persistente. Muchos pacientes con glomerulonefritis mesangial o focal mínima no presentan deterioro de la función renal (14, 27).

f) Manifestaciones del Tracto Gastrointestinal

Se han reportado anorexia, náusea, vómito y deterioro de la motilidad esofágica. Puede presentarse pancreatitis de consecuencias fatales (14, 22).

g) Manifestaciones Hepáticas

Las alteraciones hepáticas más frecuentes son: hepatitis granulomatosa, hepatitis crónica activa, cirrosis y muerte por insuficiencia hepática. La hepatitis lúpica involucra a mujeres jóvenes con cirrosis benigna e hiperactividad adrenal (14, 22).

h) Manifestaciones del Sistema Nervioso Central

Un 50% de los pacientes desarrollan alteraciones del sistema nervioso central, tales como migraña, epilepsia y neuropatía periférica. Un 75% presenta alteraciones psiquiátricas como ansiedad, alteraciones de la memoria y depresión (14, 27).

2.1.4. Autoanticuerpos

Como se mencionó anteriormente, el lupus eritematoso sistémico está caracterizado por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra constituyentes nucleares.

El concepto de anticuerpos autorreactivos tiene más de un tercio de siglo, viene de la demostración por Hasek de que el fenómeno celular lupus eritematoso (LE) descrito por Hargraves es producido por la reacción de una fracción de gammaglobulina con material nuclear.

Estos autoanticuerpos pueden dividirse en:

a) autoanticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares

- i) ácidos nucleicos (DNA, RNA)
- ii) histonas o proteínas básicas
- iii) no histonas o proteínas ácidas

b) autoanticuerpos dirigidos contra antígenos citoplasmáticos

De los anticuerpos producidos en el lupus eritematoso sistémico, algunos como el anti-DNA_n o anti-Sm, son específicos de esta enfermedad y otros como Ro/SSA o RNP_n, se presentan también en otras enfermedades reumáticas (23).

De la gran variedad de autoanticuerpos que pueden presentarse en los individuos que padecen de lupus eritematoso sistémico, los más importantes detectados en la actualidad y su frecuencia de presentación se muestran en el cuadro 1.

2.1.4.1. Autoanticuerpos Específicos

a) Anticuerpo a DNA nativo (anti-DNA_n)

Debido a que la molécula de DNA contiene múltiples epitopos los anticuerpos anti-DNA_n pueden incluir un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas con especificidad variable. Los anticuerpos contra DNA_n están dirigidos contra determinantes desoxirribosa-fosfato.

CUADRO 1
Anticuerpos presentes en sueros de individuos con
lupus eritematoso sistémico

ANTICUERPO	FRECUENCIA
DNA _n	50-70
Sm	21-30
DNP	70
Histonas	60-80
RNP	30-40
Ro/SSA	30-40
La/SSB	15-20
RNP _r	10
PCNA	10
Su	Variable
MA-1	Variable
DNA _{dc}	Variable

Tomado de *Clin Med Northam* 2:241-70, 1986

Los anticuerpos contra DNA_n están considerados como específicos del lupus eritematoso sistémico y como un signo serológico constante de la enfermedad. Están ligados a compromiso renal, existen datos que indican que los complejos antígeno-anticuerpo a base de anticuerpos contra DNA_n, participan en forma directa en la patogenia de la glomerulonefritis en el LES. la mayoría de individuos con LES y anticuerpos anti-DNA_n presentan hipocomplementemia y banda lúpica positiva.

Además de poseer un significado diagnóstico, son útiles para evaluar el pronóstico de la enfermedad, ya que los niveles de anticuerpo tienen relación con la actividad de la enfermedad, un aumento en los niveles de anticuerpo indica una exacerbación de la enfermedad, mientras que lo contrario manifiesta una mejoría de la situación clínica (3, 11, 23, 26).

b) Anticuerpos contra desoxinucleoproteína forma soluble (anti-DNP)

Están directamente implicados con el factor celular LE. Su reactividad antigénica está dirigida contra el complejo DNA-histona (23, 27).

c) Anticuerpos contra el antígeno Smith (anti-Sm)

Los enfermos que poseen anticuerpos contra el antígeno Sm padecen una forma más benigna de lupus eritematoso sistémico que los que poseen anti-DNAn (36).

d) Anticuerpos a Ma

Los pacientes con anticuerpos Ma presentan una forma más severa de lupus eritematoso sistémico que los pacientes en los que se observa anti-Sm y anti-DNAn. Se ha sugerido que los complejos inmunes antígeno Ma-anticuerpo forman parte del daño tisular mediado por complejos inmunes (16, 23).

2.1.5. Diagnóstico

Cuando se sospecha de lupus eritematoso sistémico los estudios que deben practicarse al paciente son:

- Biometría hemática completa.
- Examen general de orina.
- Determinación de anticuerpos antinucleares.
- Determinación de anticuerpos anti-DNAn.
- Determinación de complemento (C3).
- Complemento hemolítico 50.

Ya comprobado el diagnóstico, los estudios siguientes son recomendables para establecer los órganos involucrados y la intensidad de la enfermedad.

- Factor reumatoide.
- Prueba de Coombs.
- Determinación de especificidad de anticuerpos por inmunodifusión.
- Crioglobulinas.
- Determinación de complejos inmunes circulantes.
- Cuantificación de inmunoglobulinas.
- Pruebas de función renal.
- Nitrógeno ureico.
- Depuración de creatinina.

(22, 33)

2.1.6. Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con lupus eritematoso sistémico es difícil, debido a la heterogeneidad clínica de la enfermedad. Prácticamente, se tratan las manifestaciones particulares de cada paciente y no la enfermedad *per se*.

Los pacientes con alteraciones cutáneas o articulares únicamente, pueden tratarse con anti-inflamatorios no esteroideos o antimaláricos orales (4, 15, 33).

Los pacientes con enfermedad activa, requieren tratamiento con esteroides sistémicos, como la prednisona (4).

2.1.6.1. Terapia Inmunosupresora

Durante las dos últimas décadas se han empleado fármacos inmunosupresores, azatioprina y ciclofosfamida, para tratar la nefritis lúpica. El tratamiento con estos fármacos provoca menos incidencia de enfermedad renal en estadios finales, permitiendo un mejor pronóstico (4).

2.2. Determinación de anti-DNA por el Método de Inmunofluorescencia Indirecta usando como sustrato antigénico *Crithidia lucillae*

2.2.1. Antecedentes

Existen varios métodos para la determinación de anticuerpos anti-DNA. Dentro de los más útiles se encuentran: el método de Farr, método de precipitación con polietilenglicol (PEG) y a la inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato antigénico a *Crithidia lucillae*.

a) Método de Farr

En esta técnica el DNA [^3H] es aislado de bacteriófagos PM2 cultivados en presencia de timidina [^3H] y purificado siguiendo la técnica de Espejo y Canelo (7).

El DNA radiomarcado, se incuba con el suero problema, el complejo DNA-antiDNA formado, se precipita con sulfato de amonio al 50%. La comparación de radioactividad en el sobrenadante y en el precipitado da la actividad ligada al DNA (37).

b) Método de Precipitación con Polietilen Glicol (PEG)

Riley y colaboradores (20) describieron recientemente un método similar a la técnica de Farr, con la diferencia de que en vez de precipitar con sulfato de amonio al 50%, precipitan con polietilen glicol al 3.5%

2.2.2. Inmunofluorescencia Indirecta con *Crithidia luciliae* como substrato antigénico

a) Generalidades

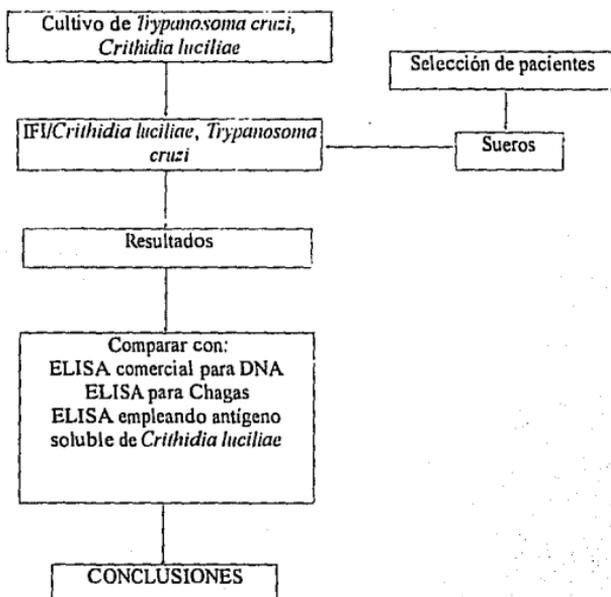
El método de inmunofluorescencia indirecta usando como substrato antigénico a *Crithidia luciliae* vino a desplazar a los anteriores, ya que es un método simple, al mismo tiempo, sensible para detectar anticuerpos anti-DNA. Este método fue introducido por Aarden y colaboradores (1).

Crithidia luciliae es un parásito hemoflagelado de aves, no patógeno al hombre, que posee un cinetoplasto gigante, formado por DNA con configuración circular (13).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Diagrama de Flujo



3.2. Material, Reactivos y Equipo

3.2.1. Material Biológico

Cultivo de *Trypanosoma Cruzi* y *Crithidia luciliae*

Ambos microorganismos se obtuvieron del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Tanto *Crithidia luciliae* como *Trypanosoma cruzi* se cultivan en medio BHI (Infusión de cerebro-corazón).

3.2.1.2. Sueros humanos

- a) 50 sueros normales, obtenidos de donadores sanos de sangre del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología.
- b) 31 sueros de pacientes con enfermedad reumática generalizada diferente a lupus eritematoso sistémico.
- c) 27 sueros de pacientes con cardiopatía chagásica crónica (CCC).
- d) 1 suero de paciente con cardiopatía hipertensa pulmonar (CHP).
- e) 22 sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES).

3.2.2. Material de Laboratorio

- Microscopio, Leitz Wetzlar, Germany.
- Microscopio de epifluorescencia, Carl Seizz, Germany.
- Refrigerador.

- Secador (aire frío y caliente).
- Cámara húmeda.
- Laminillas para inmunofluorescencia indirecta, Madesa.
- Cubreobjetos de 24 x 48 mm, Madesa.
- Vasos de Koplín, Madesa.
- Papel filtro.
- Incubadora a 37 °C.
- Incubadora a 28 °C.
- Espectrofotómetro para microplaca con capacidad de lectura a 488 ó 492 nm.
- Microplaca de poliestireno (fondo plano) para ELISA de 96 pozos.
- Pipeta multicanal de 50-200 μ l.
- Micropipetas de 5, 10 y 20 μ l.
- Matraces Erlen Meyer de 50, 100 y 250 ml.
- Vasos de precipitado 50, 100 y 250 ml.
- Matraces de aforación de 50, 100 y 1000 ml.
- Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Portaobjetos, Madesa.
- Cubreobjetos, Madesa.
- Guantes de plástico.
- Cubrebocas.
- Bulbos de seguridad.

3.2.3. Reactivos

- Fosfato dibásico de Sodio, Q.P., Baker Analyzed S.A de C.V.
- Fosfato monobásico de Sodio, Q.P., Baker Analyzed S.A. de C.V.
- Fosfato dibásico de Potasio, Q.P., Baker Analyzed S.A. de C.V.

- Fosfato monobásico de Potasio, Q.P., Baker Analyzed S.A. de C.V.
- Cloruro de Sodio, Baker Analyzed S.A. de C.V.
- Formaldehído, Q.P., Sigma.
- Azul de Evans Solución acuosa 0.5% equivalente a 0.45% de sal anhidra, Warner-Chilcott Lab.
- Tiosianato de Fluoresceína, Sigma.
- 96-99% Albúmina Bovina Fracción V, Sigma Chemical Company [N]=15.6%
- Tween 20 (Polyoxiethylene Sorbitan Monolaurate), Sigma.
- Anti IgG humano de Cabra, Sigma.
- o-Fenilendiamina, Sigma Chemical Company.
- Peróxido de Hidrógeno, 30%, Baker Analyzed.
- Citrato de Sodio hidratado, Baker Company.
- Acido Clorhídrico concentrado, Baker Analyzed.
- Sulfato de Cobre Pentahidratado, Merk.
- Hidróxido de Sodio, Q.P., Baker.
- Tartrato de Sodio y Potasio, Q.P., Baker Analyzed.
- Folin-Ciocalteu, Sigma de México.
- Carbonato de Sodio, G.A., Baker.
- Dextrosa Anhidra, G.A., Baker Analyzed.
- Agar Nutritivo, Bioxon.
- BHI (Agar Infusión Cerebro Corazón), Bioxon.
- Suero de Ternera Neonato, In Vitro, S.A.

3.2.4. Preparación de Reactivos

1. Solución salina estabilizadora (SSE) pH 7.2 (10x)

Fosfato monosódico monohidratado.....2.2 g

Cloruro de sodio 81.7 g

Agua destilada cbp 1000.0 ml

Para uso hacer una dilución 1:10

2. Solución de montaje para inmunofluorescencia indirecta

Glicerina bidestilada neutra 9 partes

Solución salina estabilizadora 1x..... 1 parte

3. Solución de azul de Evans al 1%

Azul de Evans..... 1.0 ml

Solución salina estabilizadora 1x..... 99.0 ml

4. Amortiguador de carbonatos pH 9.6

Na_2CO_3 1.52 g

NaHCO_3 2.93 g

Agua destilada cbp 1000.0 ml

Ajustar el pH con NaOH y posteriormente aforar a 1000 ml

5. Amortiguador de fosfatos salino 0.1M (10x) pH 7.2 (PBS 0.1 M pH 7.2)

NaCl..... 8.0 g

KCl..... 20.0 g

Na_2HPO_4 11.5 g

K_2HPO_4 2.0 g
Agua destilada cbp 1000.0 ml

Para emplear hacer una dilución 1:10 (PBS 0.01 M), ajustar pH y aforar a 1000 ml

6. Amortiguador de fosfatos salino-Tween 0.05% (PBS-Tween)

PBS 0.01M..... 1000.0 ml
Tween..... 0.5 ml

7. Amortiguador fosfatos salino-Tween-albúmina 1%

PBS-Tween 100.0 ml
Albúmina 1.0 g

8. Amortiguador de citratos-fosfatos

Acido cítrico 0.1 M (2.1 g / 100 ml)..... 24.3 ml
 Na_2HPO_4 (2.84 g / 100 ml) 25.7 ml
Agua destilada cbp 1000.0 ml

9. Acido sulfúrico 2.5 N

H_2SO_4 13.7 ml
Agua destilada cbp 1000.0 ml

10. Estabilizadores enzimáticos

a) PMSF 200 mM: 0.034 g / ml alcohol isopropílico, 200 μ l / 8 ml PBS 0.01 M

b) Epsilon amino-*n*-caproico 550 mM 0.065 g/ml agua, 160 μ l / 8 ml PBS 0.01 M

c) EDTA 0.2 M: 400 μ l / 8 ml PBS 0.01 M

11. Sistema revelador

orto-fenilendiamina.....8 mg

Amortiguador de citratos-fosfatos20 ml

Prepararlo en el momento de usarse ya que se descompone con la luz.

12. Medio BHI (Infusión de cerebro-corazón).

a) Fase sólida

BHI.....3.7 g

Dextrosa..... 1.0 g

Agar2.3 g

Agua destilada 100.0 ml

Esterilizar a 121°C / 15 minutos

b) Fase líquida

Solución salina estéril 0.85%, pH 7.0

Suero fetal bovino 5-10%

3.3. Metodología

3.3.1. Inmunofluorescencia Indirecta

Preparación del Antígeno

- a) Diluir la suspensión antigénica en solución salina estabilizadora, pH 7.2 (SSE pH 7.2) hasta que la concentración de parásitos muestre 10 a 15 parásitos por campo microscópico de 400 aumentos.
- b) Colocar en las laminillas para IFI, perfectamente limpias y desengrasadas, 0.020 ml de la suspensión antigénica en cada una de las divisiones marcadas.
- c) Secar por medio de aire caliente.
- d) Fijarlas a la flama suavemente.
- e) Una vez frías, lavarlas con agua destilada.
- f) Secar con aire frío.
- g) Guardar a -20°C en caso de no ser utilizadas inmediatamente.

Dilución del Conjugado

El título del conjugado se obtiene mediante diluciones al doble a partir de una dilución 1:30. La dilución óptima del reactivo es la dilución anterior a la máxima que aún da fluorescencia con un suero positivo de título conocido.

Dilución del Azul de Evans

Preparar una solución de azul de Evans al 1% en solución salina estabilizadora pH 7.2 (SSE pH 7.2). Es conveniente diluir esta solución de modo que proporcione el mejor contraste posible con los parásitos fluorescentes. Esto se realiza haciendo varias diluciones del colorante, que se prueban en un sistema conocido con un suero problema fuertemente positivo.

Dilución de los Sueros

Se hacen diluciones de los sueros problema de 1:5 a 1:1280.

Técnica

- 1) En cada pozo de la laminilla previamente sensibilizada con el antígeno, se colocan 10 μ l de las diluciones de los sueros problema y sueros testigo (tanto positivo como negativo).
- 2) Incubar en una cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
- 3) Lavar 2 veces con agua destilada y luego con solución salina estabilizadora durante 5 minutos cada vez. Finalmente se enjuaga con agua destilada.
- 4) Secar el exceso de agua con un papel filtro y después con una corriente de aire frío.
- 5) Cubrir los preparados con el conjugado convenientemente diluido en la solución de azul de Evans en su dilución óptima.
- 6) Incubar, lavar y secar las preparaciones en la forma ya descrita.

- 7) Cubrir las preparaciones con una gota de la solución de montaje, depositar cuidadosamente un cubreobjetos sobre ellas.
- 8) Observar las preparaciones en el microscopio de luz ultravioleta, comenzando con el testigo positivo, testigo negativo y posteriormente los sueros problema.

Interpretación de Resultados

En las preparaciones con los testigos negativos, los parásitos deben presentar una coloración rojiza opaca sin fluorescencia. En las preparaciones de los testigos positivos, el cinetoplasto de los parásitos debe teñirse con el fluorocromo de un color amarillo verdoso fluorescente.

Para los sueros problema, el título final de cada suero es la mayor dilución en la cual todavía se observa fluorescencia franca.

3.3.2. ELISA

Preparación del Antígeno

- a) Cosechar los parásitos a 4000 rpm a 4°C por 15 minutos.
- b) Lavar 3 veces con amortiguador de fosfatos salino 0.01M pH 7.2 (PBS 0.01M pH 7.2).
- c) Resuspender los parásitos en PBS y lisarlos (sonicándolos). Adicionar los estabilizadores enzimáticos.

- d) Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Descartar el sedimento.
- e) Determinar proteínas al sobrenadante.

Técnica

- 1) Sensibilizar la placa con 10 µg/ml de antígeno soluble en amortiguador de carbonatos (100µl/pozo), incubar 24 horas a 4°C.
- 2) Lavar 4 veces con 200 µl de PBS-Tween 0.05% por 1 minuto.
- 3) Bloquear sitios libres con PBS-Tween-albúmina sérica bovina al 1%, con 100 µl/pozo, incubar 1 hora a 37°C. Lavar una vez con PBS-Tween.
- 4) Diluir las muestras con PBS-Tween-albúmina.
- 5) Agregar 100 µl de muestra/pozo por triplicado, incubar 1 hora a 37°C.
- 6) Lavar 4 veces con PBS-Tween.
- 7) Agregar el conjugado (anti-IgG humana con peroxidasas). Incubar 1 hora a 37°C.
- 8) Lavar 6 veces con PBS-Tween.
- 9) Revelar con 8 mg de o-fenilendiamina / 20 ml de amortiguador de citratos y 8 µl de peróxido de hidrógeno (100 µl/pozo), incubar 15 minutos en la oscuridad.
- 10) Detener la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 2.5 N

11) Leer a 492 nm.

3.4. Análisis Estadístico

La especificidad y sensibilidad nosológica del método de Inmunofluorescencia Indirecta usando como sustrato antigénico cinetoplasto de *Crithidia luciliae* (IFI/*Crithidia luciliae*) para detectar anticuerpos anti-DNA en sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Especificidad nosológica $P(-1E) = d/b+d$

Sensibilidad nosológica $P(+1E) = a/a+c$

en donde:

a = Número de casos verdaderos positivos

b = Número de casos falsos positivos

c = Número de casos falsos negativos

d = Número de casos verdaderos negativos

Con el fin de validar la técnica diagnóstica de Inmunofluorescencia Indirecta usando como sustrato antigénico cinetoplasto de *Crithidia luciliae*, los resultados obtenidos se compararon con pruebas "Gold Standard" como Inmunofluorescencia Indirecta para detectar anticuerpos en la Enfermedad de Chagas, y ELISA(8).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados

a) Determinación de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG por el método de Inmunofluorescencia Indirecta usando como sustrato antigénico cinetoplasto de *Crithidia lucillae* (IFI/*Crithidia lucillae*)

De los 22 sueros provenientes de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) 19 de ellos resultaron positivos y 3 de ellos negativos. De los 31 sueros provenientes de pacientes con enfermedad reumática diferente a lupus eritematoso sistémico (ER) 2 fueron positivos, siendo los 29 restantes negativos. Tres de los sueros de pacientes con cardiopatía chagásica crónica (CCC) resultaron positivos y 24 fueron negativos. El suero proveniente de un paciente con cardiopatía hipertensa pulmonar (CHP) fue negativo (ver cuadro I).

b) Determinación de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG por el método de Inmunofluorescencia Indirecta usando cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* como sustrato antigénico (IFI/*T. cruzi*).

De los 22 sueros de pacientes con LES 18 fueron positivos y 4 resultaron negativos. De los 31 sueros de pacientes con ER únicamente 2 fueron positivos, siendo los 29 restantes negativos. De los 27 sueros de pacientes con CCC 4 dieron resultado positivo y 23 resultado negativo y el suero del paciente con CHP resultó ser positivo (ver cuadro I).

c) Determinación de anticuerpos anti-DNA isotipo IgG por la técnica de ELISA usando antígeno soluble de *Crithidia luciliae* (ELISA/C. *luciliae*).

Los resultados obtenidos en los 22 sueros de pacientes con LES fueron 19 positivos y 3 negativos. Únicamente un suero de un paciente con ER resultó ser positivo, siendo los otros 30 negativos. Los 27 sueros provenientes de pacientes con CCC dieron positivos. El suero del paciente con CHP dio negativo (ver cuadro I).

d) Determinación de anticuerpos anti-DNA isotipo IgG por la técnica de ELISA empleando antígeno soluble de *Trypanosoma cruzi* (ELISA/T. *cruzi*).

De los 22 sueros de pacientes con LES 18 tuvieron resultado positivo y 4 resultado negativo. De los 31 sueros de ER únicamente uno resultó positivo. Los 27 sueros de pacientes con CCC dieron resultado positivo. El suero del paciente con CHP resultó negativo (ver cuadro I).

De los 22 sueros provenientes de pacientes con LES únicamente en 4 los resultados no concordaron, por lo cual se les practicó un ELISA comercial, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro II.

De los sueros de pacientes con ER solo en uno no concordaron los resultados, motivo por el que se le practicó un ELISA comercial. Los resultados que se obtuvieron para este suero fueron: positivo en Inmunofluorescencia Indirecta tanto con *Crithidia luciliae* como con *Trypanosoma cruzi*, negativo en ELISA con *Crithidia luciliae* y *Trypanosoma cruzi*, en el ELISA comercial resultó positivo.

De los sueros de CCC 3 resultaron positivos para Inmunofluorescencia Indirecta tanto con *Crithidia luciliae* como con *Trypanosoma cruzi*, 2 de ellos fueron positivos con el ELISA comercial y 1 de ellos resultó positivo con el ELISA comercial.

e) Sensibilidad y especificidad de la técnica de IFI/*Crithidia luciliae* para la detección de anticuerpos anti-DNA isotipo IgG en sueros de pacientes con LES.

Del total de 81 individuos muestreados, 22 de ellos padecen LES y 59 no lo padecen. A todos se les practicó la prueba de IFI/*Crithidia luciliae*. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro III.

La sensibilidad nosológica, P(+1E), estimada fue del 86% y se estimó de la siguiente manera:

$$P(+1E) = a/a+c = 19/22 = 0.86$$

La especificidad nosológica, P(-1E), estimada fue del 92% y se estimó de la siguiente manera:

$$P(-1E) = d/b+d = 54/59 = 0.92$$

Tres casos tuvieron la prueba negativa aunque los individuos sí padecen LES. Es decir, hubo el 14% de falsos negativos, los cuales se estimaron de la siguiente manera:

$$FN = c/a+c = 3/22 = 0.14$$

Así mismo, hubo cinco casos en que la prueba fue positiva a pesar de que los individuos no padecen LES. Es decir, hubo el 8% de falsos positivos, los cuales se estimaron de la siguiente manera:

$$FP = b/b+d = 5/59 = 0.08$$

f) Sensibilidad y especificidad de la técnica de IFI/*Trypanosoma cruzi* para la detección de anticuerpos anti-DNA isotipo IgG en sueros de pacientes con LES.

Del total de 81 individuos muestreados, 22 de ellos padecen LES y 59 no lo padecen. a todos se les practicó la prueba de IFI/*Trypanosoma cruzi*. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro IV.

La sensibilidad nosológica, P(+1E), estimada fue del 82% y se calculó de la siguiente manera:

$$P(+1E) = a/a+c = 18/22 = 0.82$$

La especificidad nosológica, P(-1E), estimada fue del 90% y se calculó de la siguiente manera:

$$P(-1E) = d/b+d = 53/59 = 0.90$$

Cuatro casos tuvieron la prueba negativa aunque los individuos sí padecen LES. Es decir, hubo el 18% de falsos negativos, los cuales se estimaron de la siguiente manera:

$$FN = c/a+c = 4/22 = 0.18$$

Existieron 6 casos en que la prueba fue positiva en ausencia de la enfermedad, por lo que hubo el 10% de falsos positivos, los que se calcularon como sigue:

$$FP = b/b+d = 6/59 = 0.10$$

g) Sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA/*Crithidia luciliae* para la detección de anticuerpos anti-DNAN isotipo IgG en sueros de pacientes con LES.

Del total de 81 individuos muestreados, 22 de ellos padecen LES y 59 no lo padecen. A todos se les practicó la prueba de ELISA/*Crithidia luciliae*. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro V.

La sensibilidad nosológica, P(+1E), estimada fue del 86% y se calculó de la siguiente manera:

$$P(+1E) = a/a+c = 19/22 = 0.86$$

La especificidad nosológica, P(-1E), estimada fue del 53% y se determinó de la siguiente forma:

$$P(-1E) = d/b+d = 31/59 = 0.43$$

Tres casos tuvieron la prueba negativa a pesar de padecer LES. Es decir, existió el 14% de falsos negativos, los cuales se estimaron de la siguiente manera:

$$FN = c/a+c = 3/22 = 0.14$$

Así mismo, existieron 28 casos en que la prueba fue positiva no obstante que el padecimiento no estaba presente en estos individuos, por lo que el porcentaje de casos falsos positivos de la prueba fue del 47% y se determinó como sigue:

$$FP = b/b+d = 28/59 = 0.47$$

h) Sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA/*Trypanosoma cruzi* para la detección de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG en sueros de pacientes con LES.

Del total de 81 pacientes muestreados, 22 de ellos padecen LES y 59 no lo padecen. A todos se les practicó la prueba de ELISA/*Trypanosoma cruzi*. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro VI.

La sensibilidad nosológica, P(+1E), estimada fue del 82% y se calculó de la siguiente manera:

$$P(+1E) = a/a+c = 18/22 = 0.82$$

La especificidad nosológica, P(-1E), estimada fue del 54%, se determinó como se muestra:

$$P(-1E) = d/b+d = 32/59 = 0.54$$

Existieron cuatro casos en los que la prueba dio negativa aunque los individuos muestreados sí padecen de LES, por lo que el porcentaje de falsos negativos fue del 18%. Este porcentaje se estimó como sigue:

$$FN = c/a+c = 4/22 = 0.18$$

Hubo 27 casos en los que la prueba fue positiva a pesar de estar ausente la enfermedad en los individuos muestreados, por lo que existió el 46% de falsos positivos, los cuales se estimaron como sigue:

$$FP = b/b+d = 27/59 = 0.46$$

CUADRO I
Determinación de anticuerpos anti-DNA isotipo IgG

ENFERMEDAD	IFI/C.luciliae	IFI/T.cruzi	ELISA/C.luciliae	ELISA/T.cruzi
LES	19(+) 3(-)	18(+) 4(-)	19(+) 3(-)	18(+) 4(-)
ER	2(+) 29(-)	2(+) 29(-)	1(+) 30(-)	1(+) 30(-)
CCC	3(+) 24(-)	4(+) 23(-)	27(+)	27(+)
CHP	1(-)	1(+)	1(-)	1(-)

Abreviaturas: LES: lupus eritematoso sistémico, ER: enfermedad reumática diferente a LES, CCC: cardiopatía chagásica crónica, CHP: cardiopatía hipertensa pulmonar, IFI/C.luciliae: Inmunofluorescencia indirecta usando cinetoplasto de *C.luciliae* como antígeno, IFI/T.cruzi: Inmunofluorescencia indirecta usando cinetoplasto de *T.cruzi* como antígeno, ELISA/C.luciliae: ELISA con antígeno soluble de *C.luciliae*, ELISA/T.cruzi: ELISA con antígeno soluble de *T.cruzi*.

CUADRO II

Comparación de la determinación de anticuerpos anti-DNA isotipo IgG de 4 sueros provenientes de pacientes con LES con un ELISA comercial para detectar anticuerpos anti-DNA

SUERO	IFI/C.luciliae	IFI/T.cruzi	ELISA/C.luciliae	ELISA/T.cruzi	ELISA/com
1	+	-	+	+	+
2	+	+	-	-	+
3	-	+	+	+	+
4	-	-	+	-	+

Abreviaturas: IFI/C.luciliae: Inmunofluorescencia indirecta usando cinetoplasto de *C.luciliae* como antígeno, IFI/T.cruzi: Inmunofluorescencia indirecta usando cinetoplasto de *T.cruzi* como antígeno, ELISA/C.luciliae: ELISA con antígeno soluble de *C.luciliae*, ELISA/T.cruzi: ELISA con antígeno soluble de *T.cruzi*, ELISA/com: ELISA comercial para detectar anticuerpos anti-DNA.

CUADRO III

Certeza diagnóstica de la prueba de Inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato antigénico cinetoplasto de *Crithidia luciliae* para la detección de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG en pacientes con lupus eritematoso sistémico

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (<i>Crithidia luciliae</i>)	LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO		TOTAL
	Presente	Ausente	
Positiva	19	5	24
Negativa	3	54	57
TOTAL	22	59	81

CUADRO IV

Certeza diagnóstica de la prueba de Inmunofluorescencia indirecta usando como sustrato antigénico cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* para la detección de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG en pacientes con lupus eritematoso sistémico

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO		TOTAL
	Presente	Ausente	
Positiva	18	6	24
Negativa	4	53	57
TOTAL	22	59	81

CUADRO V

Certeza diagnóstica de la prueba de ELISA usando antígeno soluble de *Crithidia luciliae* para la detección de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG en pacientes con lupus eritematoso sistémico

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (<i>Crithidia luciliae</i>)	LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO		TOTAL
	Presente	Ausente	
Positiva	19	28	47
Negativa	3	31	34
TOTAL	22	59	81

CUADRO VI

Certeza diagnóstica de la prueba de ELISA usando antígeno soluble de *Trypanosoma cruzi* para la detección de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG en pacientes con lupus eritematoso sistémico

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO		TOTAL
	Presente	Ausente	
Positiva	18	27	45
Negativa	4	32	36
TOTAL	22	59	81

4.2. Discusión

De los resultados obtenidos en este estudio se pone de manifiesto que, para la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos anti-DNA_n isotipo IgG, el substrato antigénico que mejor funciona es el cinetoplasto de *Crithidia luciliae*, ya que con este substrato se obtuvo la mayor sensibilidad y especificidad. Esto se debe en gran medida a que *Crithidia luciliae* en su morfología es más "redonda" que *Trypanosoma cruzi*, el cual es más "alargado", lo que permite una mejor observación del cinetoplasto.

Lo anterior también se evidencia al compararse la inmunofluorescencia indirecta usando como substrato antigénico cinetoplasto de *Crithidia luciliae*, en donde únicamente en un suero no concordaron los resultados (cuadro II).

En la técnica de ELISA empleando como antígeno soluble tanto a *Crithidia luciliae* como a *Trypanosoma cruzi*, teóricamente los sueros de enfermos de LES deberían de dar resultado negativo. Lo anterior no sucedió así, ya que 18 sueros dieron resultado positivo. Una razón por la cual esto pudiera suceder es que el antígeno tuviera restos de DNA, lo cual fue comprobado practicándosele al antígeno una sonda de DNA (estudio realizado amablemente por la Q.F.B. Mireya Romero).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Ya que *Crithidia luciliae* no es patógeno al ser humano y puede ser cultivado y mantenido fácilmente en el laboratorio, es un sustrato adecuado para la detección de anticuerpos anti-DNA, lo cual suprime la purificación del DNA.
2. Permite la detección de inmunoglobulina específica, en este caso IgG.
3. En contraste a otros métodos, como la fluorescencia de anticuerpos antinucleares (FANA), tiene alto grado de sensibilidad y especificidad.
4. Es un método útil para evaluar la respuesta al tratamiento, debido a que el nivel de anticuerpos se encuentra en relación con la actividad de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Aarden, L. A., De Groot, E. R., Feltkamp, T. E. W.: Immunology of DNA III *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-DNA with the immunofluorescence technique. *Ann NY Acad Sci* 254:505-515 (1975).
2. Ballou, S. P., Kushner, I.: Anti-native DNA detection by the *Crithidia luciliae* method. *Arthritis Rheum* 22:321-327 (1979).
3. Ballou, S. P., Kushner, I.: Immunochemical characteristics of antibodies to DNA in patients with active systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 37:58-67 (1979).
4. Ballou, S. P.: Systemic lupus erythematosus. Controversies in management. *Postgrad Med* 81:157-164 (1987).
5. Bellanti, J. A.: *Inmunología*. Interamericana. 3a. ed. México, D.F. (1988).
6. Decker, J. L., et al: Systemic Lupus Erythematosus. Evolving concepts. *Annals of Internal Medicine* 91(4):587-604 (1979).
7. Espejo, R. T., Canelo, S.: Properties of bacteriophage PM2: a lipid-containing bacteriophage. *Virology* 34:738 (1968).
8. Feinstein, A.: *Clinical Epidemiology*. Ed. Saunders & Co. Philadelphia, E.U.A. (1985).

9. Feller, M. J., et al: Immunology of the skin disease. Oxxord elsevier, 1a. ed. pp. 215-235 (1980).
10. Granier, F., et al: Nailfold capillary microscopy in mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 29:189-195 (1986).
11. Koefler, D., et al: Anti-DNA antibodies and renal lesions of patients with systematic lupus erythematosus. *Transplant Proc* 1:933-938 (1968).
12. Koefler, D., Biesecker, G., Moriber, K., S.: Immunopathogenesis of the Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:585-562 (1982).
13. Laurent, et al: The *Crithidia luciliae* kinetoplast. *Clin Exp Immunol* 25:480-486 (1976).
14. Lee, L. A., Metson, W. L.: Lupus erythematosus in childhood. *Dermatol Clin* 4:151-160 (1986).
15. Manich, M.: Mecanism of tissue deposition of immune complexes. *J rheumatol* 14 suppl 13:35-42 (1987).
16. Mc Carty, G. A.: anticuerpos y su relación con enfermedades reumáticas. *Clin Med Norteam* 2:241-27 (1986).
17. Reichlin, M.: current perspectives on serological reactions in systemic Lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* 44:1 (1981).
18. Reyes, P. A.: Lupus eritematoso sistémico. *Tribuna Médica XLV* (9):9 (1983).

19. Reyes López, P. A., Arroyave, C. M.: Anticuerpos Antinucleares y el Sistema del Complemento en Enfermedades Reumáticas Generalizadas. *Biométrica*, 2(1):1-10 (1977).
20. Riley, R. L., Mc Grath Jr., H., Taylor, R. P.: Detection of low-avidity anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 22:219 (1979).
21. Rodman, G., Schumacher, R.: Systemic lupus erythematosus. En *Primer on the rheumatic disease*. 8va. ed. Arthritis Foundation, U.S.A. (1983).
22. Rook, A., Wilkinson, D. A., Ebling, F. L.: *Textbook of Dermatology*. Oxford Blackwell Scient Pub., 4a. ed. (1986).
23. Rose, N. R., Herman, F., Fahey, J. L.: Immunofluorescent Antinuclear antibody Test. En *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. American Society for Microbiology. 3a. ed. pp. 733-754 (1986).
24. Rothfield, V.: Systemic lupus erythematosus: Clinical aspects and treatment, in *Arthritis and Allied Conditions*, 10a. ed. D. J. McCarty (Ed), Filadelfia (1985).
25. Schur, P. H., Sandson, J.: Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 278:533 (1986).
26. Swaak, A. J. G., et al: Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 22:226-235 (1979).
27. Synkowski, D. R., Mogarevo, D.: Lupus erytematoso. Estudios de laboratorio y subgrupos clínicos en la valoración de los enfermos. *Clin Med Nortam* 16:913-932 (1980).

28. Tan, E. M.: Immunopathology and pathogenesis of cutaneous involvement in systemic lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 67:360-365 (1976).
29. Tan, E. M.: Autoantibodies to nuclear antigen (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 23:167-240 (1982).
30. Tan, E. M.: Systemic lupus erythematosus: Immunological aspects, in *Arthritis and Allied Conditions*, 10a. ed., D. J. McCarty (Ed) Filadelfia (1985).
31. Taurog, J. D., Steinberg, A. D.: Genetic and Immune Aspects of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Derm* 20:149-158 (1981).
32. Tsokos, G. C.: Biochemical and molecular abnormalities in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology* 9:533-539 (1991).
33. Tuffanelli, D. L.: Lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 4:127-142 (1981).
34. Velasco, C. O., Guzmán, B. C.: Importancia de la enfermedad de Chagas en México. *Rev Lat-amer Microbiol* 28:275-283 (1986).
35. Walport, M. J., Black, C. M.: The immunogenetics of systemic lupus erythematosus. *Clinics in rheumatic diseases* W. P. Saunders Co., London Philadelphia. (1982).
36. Winn, D. M., Wolfe, J. F.: Identification of a clinical subset of systemic lupus erythematosus by antibodies to Sm antigen. *Arthritis Rheum* 22:1334-1337 (1979).
37. Wold, R. T., et al: Deoxyribonucleic acid antibody, a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid. *Science* 161:806 (1968).