

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



Jordana María Catalan López

Química Bióloga

Guatemala, noviembre de 2018.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Determinación de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones de sueros de
personas sanas guatemaltecas.**

Proyecto de Investigación

Presentado por

Jordana María Catalan López

**Para optar al título de
Química Bióloga**

Guatemala, noviembre de 2018.

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Ruben Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por brindarme la guía y la fortaleza a lo largo el trayecto para alcanzar este logro.

A MI FAMILIA

Por su apoyo incondicional, entrega, trabajo y sacrificio.

**A LAS UNIDADES DE
INVESTIGACIÓN**

Unidad de Reumatología, Hospital Roosevelt y Dirección De Investigación De La Facultad De Ciencias Médicas.

**A LA TRICENTENARIA
UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA**

Por brindarme la preparación adecuada para la formación como profesional.

Índice

I.	Ámbito de la investigación	1
II.	Resumen.....	2
III.	Antecedentes	3
	A. Autoinmunidad	3
	B. Enfermedades Autoinmunes.....	3
	1. Lupus eritematoso.....	3
	2. Artritis reumatoide.....	4
	3. Enfermedad mixta del tejido conectivo.....	4
	4. Esclerosis sistémica	5
	5. Síndrome de Sjögren	6
	6. Vasculitis.....	7
	C. Anticuerpos antinucleares	8
	1. Clasificación de los anticuerpos antinucleares.....	9
	2. Técnicas utilizadas para la detección de ANA.....	9
	D. Anticuerpos antinucleares en poblaciones sanas.....	11
	E. Utilidad diagnóstica de los ANA en enfermedades autoinmunes.....	13
	F. Antecedentes de los ANA en Guatemala.....	16
IV.	Justificación	17
V.	Objetivos	18
VI.	Hipótesis.....	19
VII.	Materiales y Métodos	20
	A. Universo y muestra.....	20
	B. Recursos.....	20
	C. Materiales.....	21
	D. Métodos.....	22
VIII.	Control de calidad	26
IX.	Observación y reporte de resultados	26

X.	Metodología.....	27
XI.	Criterios de inclusión	28
XII.	Consideraciones éticas del estudio.....	28
XIII.	Procesamiento de datos y análisis estadístico	29
XIV.	Resultados.....	30
XV.	Análisis y discusión de resultados.....	35
XVI.	Conclusiones.....	38
XVII.	Recomendaciones.....	39
XVIII.	Referencias.....	40
XIX.	Anexos.....	46

I. Ámbito de la investigación

Los anticuerpos antinucleares son de importancia ya que son utilizados como una prueba de tamizaje para la detección de enfermedades reumatológicas autoinmunes de manera que su estudio para establecer dichos anticuerpos será aplicable en el ámbito de la salud.

Este estudio propone determinar cuál es la dilución óptima de anticuerpos antinucleares (ANA) mediante inmunofluorescencia en el que se llevó a cabo con pacientes sanos que previenen a banco de sangre del Hospital Roosevelt de la ciudad de Guatemala. Es de suma importancia obtener la dilución que presente el mejor rendimiento para la realización de los anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia (FANA), ya que se desconoce la frecuencia de ANA en la población guatemalteca sana, para ello se tomó una muestra de sangre de donadores de sangre que asisten al banco de sangre del Hospital Roosevelt durante el período de enero a junio del 2017.

Este estudio se realizó como parte del proyecto de investigación DIGI-USAC denominado “Determinación de la dilución óptima para anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia para el diagnóstico de enfermedades reumatológicas autoinmunes” con el número de partida presupuestaria: 4.8.63.1.03, el cual también incluyó pacientes con sospecha de enfermedades reumatológicas autoinmunes que asisten a la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt con el propósito de evaluar la precisión diagnóstica (sensibilidad, especificidad y razones de verosimilitud) de los FANA.

II. Resumen

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son inmunoglobulinas dirigidas contra antígenos celulares. Estos anticuerpos se encuentran presentes en muchas enfermedades reumatológicas autoinmunes (ERA), sin embargo estos anticuerpos también pueden presentarse en personas sanas. El presente estudio se desarrolló con el objetivo de establecer la dilución óptima para la detección de anticuerpos antinucleares, mediante inmunofluorescencia (FANA) para poder establecer un diagnóstico de una ERA. Para realizar el estudio se muestreó 814 personas sanas que donan sangre. Se realizó un FANA del suero obtenido de los pacientes con diluciones de 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280. Se calculó la sensibilidad, especificidad y razones de verosimilitud utilizando el paquete estadístico EPIDAT para cada una de las diluciones. El grupo sano presentó un 13.3 %, 8.2 % y 3.9 % de positividad para los FANA en las diluciones 1/80, 1/160 y 1/320 respectivamente. El porcentaje de positividad aumentaba a medida que incrementaba la edad. Se encontró que la dilución 1/80 presentó la mejor sensibilidad (90.3 %), razón de verosimilitud negativa (RV) - (0.14), la dilución 1/1280 presentó la mejor especificidad (96.3 %), y la dilución 1/640 presentó la mejor razón de verosimilitud positiva (RV +) (9.68). La dilución óptima que presentó una buena sensibilidad y especificidad (83.1 %) es la 1/80.

Palabras clave: inmunoglobulina, inmunología, reumatología, autoinmunidad, laboratorio.

III. Antecedentes

A. Autoinmunidad

Se define autoinmunidad como un trastorno del sistema de defensa del organismo, en el cual se producen auto-anticuerpos contra componentes propios, debido a la incapacidad de este para reconocerlos, y considerándolos extraños induce una respuesta para destruirlos. Los primeros conceptos de autoinmunidad surgen a finales del siglo XIX. En 1896 Lord Lister planteó en la Asociación Médica Británica la controversia sobre si la inflamación es una respuesta anormal o un mecanismo de defensa. Un año después Paul Ehrlich genera la fundamentación teórica de las cadenas laterales, lo cual da la base para explicar el “horror autotóxico”. En 1906 Clemens Freiherr von Pirquet al analizar la enfermedad del suero planteó la siguiente frase: “La concepción del anticuerpo es que protege contra la enfermedad, pero también son responsables de generar enfermedad, lo que parece absurdo” (Iglesias, Siachoque, Pons, Restrepo, Quintana & Gómez, 2009).

B. Enfermedades autoinmunes

1. Lupus eritematoso.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune compleja que puede afectar a cualquier órgano, con un espectro de manifestaciones clínicas e inmunológicas muy variado, y un curso clínico caracterizado por episodios de exacerbación y remisión de la enfermedad. Afecta predominantemente a mujeres en edad fértil, con una relación mujer/hombre de 9/1. Es habitual entre la segunda y cuarta décadas de la vida, aunque se puede ver a cualquier edad. Aparece en todas las razas, si bien la enfermedad parece ser más severa en ciertas etnias, como la negra, o en personas de origen hispano. Existe una predisposición genética, existiendo mayor probabilidad de enfermedad en los miembros de las familias de enfermos de LES que en la población general. LES es la enfermedad autoinmune no órgano-específica por excelencia. En su patogenia intervienen diferentes factores genéticos, hormonales y ambientales, que interaccionan dando lugar a una pérdida de la tolerancia del organismo a sus propios constituyentes, lo que ocasiona la producción de autoanticuerpos, la formación de complejos inmunes y finalmente la producción de daño

tisular. Con frecuencia se detectan factores desencadenantes, como la exposición a la luz ultravioleta, las situaciones de estrés, infecciones o ciertos fármacos (Cervera, Khamashta, Font, Sebastiani, Gil, Lavilla & Doménech, 1993).

2. Artritis reumatoide

Es una enfermedad inflamatoria, crónica, autoinmune y sistémica de etiología desconocida; su principal órgano blanco es la membrana sinovial; se caracteriza por inflamación poliarticular y simétrica de pequeñas y grandes articulaciones, con posible compromiso sistémico en cualquier momento de su evolución. (Mody & Cardiel, 2008).

Es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación de 3:1, esta diferencia entre sexos disminuye a edades más avanzadas. Si bien, aproximadamente del 5 al 20% de los pacientes con artritis reumatoide (AR) presentan un curso autolimitado, el resto de los pacientes presentan patrones con exacerbaciones y remisiones parciales o completas o de curso rápidamente progresivo, que de no limitarse provocan daño articular irreversible, limitación funcional y discapacidad así como disminución en la calidad de vida de los pacientes. La AR constituye un problema de salud pública debido a su prevalencia, las consecuencias funcionales y el impacto socioeconómico en el uso de los servicios de salud. La mortalidad reportada en pacientes con AR es mayor que en la población general, demostrándose una reducción en su expectativa de vida. (Wolfe, 1996). El diagnóstico y tratamiento oportuno de la AR, incrementa la probabilidad de controlar el proceso inflamatorio, limitar la progresión del daño, mejorar la calidad de vida, la funcionalidad y la pronta reincorporación a la vida productiva y social del paciente (Ramos, Salcedo, Prieto & 2000).

3. Enfermedad mixta del tejido conectivo

La enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) fue definida por primera vez en 1972 por Sharp y colaboradores, como una conectivopatía caracterizada por la combinación de manifestaciones propias de lupus eritematoso sistémico (LES), de esclerosis sistémica (ES) y de polimiositis (PM) asociadas a la presencia de un anticuerpo entonces denominado anti-

antígenos extraíbles del núcleo (anti-ENA) y actualmente conocido como anti-U1-ribonucleoproteína (anti-U1-RNP) (Sharp, Irvin & Tan, 1972).

La EMTC es más frecuente en mujeres que en hombres, la edad de inicio, por lo general, se sitúa entre los 20 y los 40 años. Las manifestaciones clínicas iniciales en la EMTC pueden consistir en alteraciones inespecíficas como malestar general, mialgias, artralgias y febrícula. Entre las manifestaciones clínicas de la EMTC se encuentran las dermatológicas, siendo la más frecuente el edema de manos asociado al fenómeno de Raynaud que suele aparecer en estadíos precoces de la enfermedad. También se ha descrito calcinosis cutánea y de partes blandas, esclerodactilia, exantema malar, placas discoides, úlceras orogenitales, xerodermia, livedo reticularis y nódulos subcutáneos. La fiebre puede ser la manifestación inicial asociada o no a miositis, meningitis aséptica, serositis, linfadenopatías o infección. La artritis en la EMTC es más frecuente y agresiva que en LES. El 60% de los pacientes desarrolla una artritis franca, pudiendo presentar deformidades similares a las de la artritis reumatoide. Algunos pacientes pueden llegar a desarrollar una artritis destructiva. Un 70% de los pacientes con EMTC presentan positividad para el factor reumatoide y un 50% para el anticuerpo antipéptido citrulinado, lo que inicialmente podría ser motivo de confusión diagnóstica (Mimura, Ihn & Jinnin, 2006).

4. Esclerosis Sistémica

La esclerosis sistémica (ES) también denominada esclerodermia, es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la inflamación y fibrosis principalmente cutánea, concomitante al daño endotelial y afección inflamatoria de vasos sanguíneos, tejidos osteomusculares y órganos internos. Según la extensión del compromiso cutáneo se puede clasificar la ES en difusa (ESD) o ES limitada (ESL). La primera se caracteriza por el endurecimiento generalizado de la piel, compromiso frecuente de órganos internos, siendo esta presentación clínica la de peor pronóstico. La ESL se caracteriza por el endurecimiento de la piel a nivel distal en extremidades, cara y cuello, menor compromiso de órganos interno y mejor pronóstico comparada con la esclerosis sistémica difusa (LeRoy, 1996). La sobreproducción de matriz extracelular por parte de los fibroblastos es el principal marcador de la esclerodermia. La acumulación de colágeno es resultado de una interacción

anormal entre las células endoteliales, las células mononucleares (linfocitos y monocitos) y los fibroblastos, lo que conduce a la producción de citoquinas inductoras de fibrosis, en un contexto de hiperreactividad vascular e hipoxia tisular (Roa, 2005).

5. Síndrome de Sjögren

El Síndrome de Sjögren (SS) se consideró en sus inicios una enfermedad local de las glándulas parótidas; hasta considerarse una enfermedad reumática, inclusive, como una variante de la artritis reumatoide desde los inicios y hasta mediados del siglo XX, en la que posteriormente se distinguió para obtener categoría propia como una enfermedad inmunológica donde las células dianas serían las glándulas de secreción externa, en la cual se encuentran linfomas y otros tipos de afecciones tumorales como parte de su progresión natural. Es una enfermedad autoinmune caracterizada por un infiltrado de células linfomonocitarias y atrofia acinar de las glándulas exocrinas, que producen una disminución o ausencia de las secreciones glandulares y sequedad de piel y mucosas; las manifestaciones clínicas más frecuentes son: xeroftalmía, xerostomía y el aumento de las glándulas parótidas (Barile & Xibille, 2003).

La enfermedad tiene una prevalencia entre un 2 y 5 % en la población general, afectando con preferencia a las mujeres entre la cuarta y sexta décadas de la vida, son más frecuente los hallazgos relacionados con la disminución de la secreción vaginal y la presencia de síntomas generales (Roser, Labrador & Bosch, 2001).

En la patología del SS se pueden identificar 3 fases o etapas, en donde la primera fase, que resulta asintomática, incluye los factores internos o intrínsecos en el individuo. Otro factor en esta primera fase está dado por las hormonas sexuales, relacionado con la mayor frecuencia que se presenta en las mujeres respecto a los hombres; lo cual está asociado al concepto de que los estrógenos son inmunoestimulantes y los andrógenos inmunosupresores en los procesos autoinmunes. La segunda fase, denominada fase de iniciación, está caracterizada por alteraciones que se presentan en los mecanismos de apoptosis celular de tipo no inflamatorio, favorecidos por elementos locales y factores medioambientales o extrínsecos al individuo. Y la tercera fase es la mejor comprendida por

las múltiples investigaciones que existen al respecto. Está dada por la respuesta inflamatoria tanto celular como mediada por factores solubles, y va a ser la responsable de la destrucción del epitelio secretor de las glándulas afectadas, dando lugar al cuadro clínico de la enfermedad (Cañas, 2001).

6. Vasculitis

El término vasculitis comprende un grupo de condiciones o síndromes, que se caracteriza por inflamación y necrosis de las paredes de los vasos sanguíneos. La vasculitis sistémicas constituyen un grupo altamente heterogéneo de enfermedades que abarcan desde procesos benignos, autolimitados, a procesos que amenazan gravemente la vida de los pacientes. Sus manifestaciones clínicas, tratamiento y pronóstico dependerán de la extensión y ubicación de las lesiones como del tamaño de los vasos afectados. De acuerdo a su etiología, la vasculitis se puede clasificar en primaria o idiopática y secundaria a otros procesos, asociadas a procesos malignos, a drogas u otros antígenos exógenos o vasculitis idiopáticas. Según su extensión anatómica la vasculitis puede ser un proceso multisistémico o bien un fenómeno localizado a un aparato o sistema (Cid, 2000).

Se han propuesto numerosas clasificaciones de vasculitis. El Colegio Americano de Reumatología tiene criterios de clasificación para siete vasculitis primarias: poliarteritis nodosa, síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, vasculitis de hipersensibilidad, púrpura de Henoch-Schönlein, arteritis de células gigantes y arteritis de Takayasu (Bloch, Michel & Hunder, 1990).

La patogénesis de las vasculitis es poco conocida. Tres posibles mecanismos de daño vascular son la deposición de complejos inmunes, ANCA's (respuesta humoral) y respuesta de linfocitos T con formación de granuloma (mediada por células). El resultado final de estas vías es la activación de las células endoteliales, con posterior obstrucción de los vasos y la isquemia del tejido dependiente. Esto puede causar hemorragia en los tejidos circundantes y, en algunos casos, debilitamiento de la pared del vaso, lo que conduce a la formación de aneurismas. Para casi todas las formas de vasculitis, el evento desencadenante que inicia y conduce esta respuesta inflamatoria es desconocido. Muchas vasculitis de

vasos pequeños tienen una escasez de depósitos vasculares inmunes y, por lo tanto, se han buscado otros mecanismos para estas llamadas vasculitis inmunes. Los pacientes con vasculitis típicamente tienen síntomas prodrómicos, trastornos constitucionales y manifestaciones específicas de órganos. Las manifestaciones varían, dependiendo del tamaño, sitio y extensión de los vasos involucrados. Las vasculitis sistémicas primarias son difíciles de diagnosticar porque las manifestaciones clínicas imitan varias enfermedades infecciosas, neoplásicas y autoinmunes. La edad, el sexo y el origen demográfico o étnico del paciente también son importantes. Finalmente, se debe determinar el tipo y la extensión de la afectación de los órganos y el tamaño de los vasos involucrados. Ciertos síntomas específicos de órganos, no explicados de otro modo, pueden ser pistas que conducen a un diagnóstico más específico (Sneller & Fauci, 1997).

C. Los anticuerpos antinucleares

Son inmunoglobulinas que reconocen componentes celulares autólogos (nucleares y citoplasmáticos). (Cabiedes & Núñez, 2010). Su detección es importante no sólo para el diagnóstico, sino también para el estudio de la evolución de enfermedades donde su expresión es común, como: artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, cirrosis pancreática, hepatitis crónica y miastenia gravis, entre otras.

Es bien conocido que en personas sanas y en sujetos con infecciones activas, estos anticuerpos pueden existir en títulos inferiores a lo reportado en las enfermedades del tejido conectivo. Ahora se sabe que la prevalencia de autoanticuerpos en individuos sanos aumenta con la edad, así como con aberraciones inmunológicas celulares y tumorales. (De Vlam, De Keyser, Verbruggen, Vandenbossche, Vanneuville & D'Haese, 1993).

Los anticuerpos antinucleares fueron evidenciados por primera vez en 1949 en sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Esta investigación demostró que cuando el suero de pacientes con LES era incubado con leucocitos, se producían alteraciones nucleares junto con fagocitosis de remanentes nucleares por los polimorfonucleares. Al año siguiente se demostró que el fenómeno de las células LE era ocasionado por un factor

sérico que reaccionaba contra material nuclear. Este factor fue subsecuentemente llamado “Factor antinuclear” (Hargraves, Richmond, & Morton, 1949).

1. Clasificación de ANA

En circulación pueden estar presentes tres tipos de ANA. Uno de ellos está presente en todos los individuos a títulos relativamente bajos y forman parte del repertorio de los ANA naturales. Un segundo tipo de ANA son los que se producen como resultado de procesos infecciosos. En este sentido, los ANA cuyo origen son los procesos infecciosos no se asocian a manifestaciones clínicas de enfermedad autoinmune y sus títulos bajan en cuanto se resuelve el proceso infeccioso que les dio origen (Conrad, SchoBler, Hiepe & Fritzler, 2002). El tercer tipo es el de los ANA autoinmunes, los cuales reflejan la pérdida de la tolerancia inmunológica y su origen es multifactorial. Su producción depende de carga genética, medio ambiente, cambios hormonales, entre otros (Shoenfeld, Gershwin & Meroni, 2007).

2. Técnicas utilizadas para la detección de ANA

En una investigación llevada a cabo por Friou (1957) se aplicó la técnica desarrollada por Weller & Coons (1954) para confirmar que las globulinas contenidas en los sueros de pacientes con LES poseían afinidad por el núcleo de la célula. La afinidad de los sueros de 100 personas, incluidas 28 con LES, fue comprobada contra núcleos de timo de cordero y tejidos de mamíferos. Una anti-globulina humana marcada con un fluorocromo fue agregada a los tejidos, posterior a una incubación con el suero de las personas. Esto evidenció un aumento de la intensidad en la fluorescencia cuando se utilizaron los sueros de pacientes con LES. Los estudios posteriores de Friou permitieron la estandarización de la técnica y su aplicación para el estudio y diagnóstico de ERA (Friou, 1958a; Friou, 1958b; Friou, 1958c; Friou, Finch, & Detrie, 1958; Friou, 1964; Friou & Teague, 1964).

La utilización de la técnica de inmunofluorescencia para la investigación de anticuerpos antinucleares permitió evidenciar diferentes patrones de tinción en los núcleos de las

células utilizadas. Esta situación fue inicialmente descrita por Beck (1961) y un par de meses después confirmada por Lanchmann & Kunkel (1961) y por Fennell, Rodnan, & Vázquez (1962). Los estudios de Becks fueron realizados desde 1961 hasta 1968 culminando con la descripción de los 4 primeros patrones observados en inmunofluorescencia.

La técnica de inmunofluorescencia (IFI) es la prueba tamiz para identificar los patrones, pero carece de especificidad. La abundancia de los ANA se determina por titulación, es decir, la dilución más alta del suero a la cual la fluorescencia es positiva; la especificidad de los anticuerpos se revela por la localización de la fluorescencia. Pueden distinguirse los patrones homogéneo, periférico, nucleolar y varios tipos de patrones moteados (en cultivos de líneas celulares) que reflejan la unión de anticuerpos a determinadas estructuras nucleares (Tan, Feltkamp, Smolen, Dawkins, Fritzler, Gordon & Koziol, 1997).

Muchos de los sustratos hasta ese momento utilizados poseían la desventaja de ser muy poco sensibles y rápidamente se detectaron discrepancias entre ellos. Esto llevó a la investigación de los ANA en diferentes sustratos, observándose diferencias en la detección de los títulos finales y deficiencias en el discernimiento de los patrones nucleares. Uno de los primeros estudios llevados a cabo fue el de Muna, Verner, & Hammond (1966) en el cual se empezó a utilizar cultivos celulares para la investigación de los ANA. Estudios posteriores en los que se compararon cortes histológicos contra monocapas de cultivos celulares identificaron a estos últimos como los más sensibles para la detección de los ANA.

Dentro de las ventajas identificadas en estos estudios cabe mencionar la disponibilidad de estos sustratos debido a la inmortalidad de las líneas celulares, la homogeneidad de las líneas celulares, la facilidad del discernimiento de los patrones de los ANA, su alta sensibilidad y su potencial para la preservación por largo tiempo del sustrato no teñido (Lippmann, Eckert, Hahon, & Morgan, 1973; Hahon, Eckert, & Stewart, 1975).

El sustrato utilizado para la detección de los ANA es muy importante, ya que existen antígenos cuya concentración en las células de los tejidos es muy baja en contraste con lo

que sucede en las células HEp-2. Otra característica de estas células es que tienen más de 46 cromosomas, más de dos nucléolos y, por ser células muy activas metabólicamente, tienen una gran cantidad de mitocondrias. Su núcleo es más grande que el de cualquier célula epitelial normal, por ello la observación de patrones nucleares y citoplásmicos se convierte en una tarea relativamente fácil. Sin embargo, es importante confirmar la especificidad de los autoanticuerpos detectados mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), EIT también conocida como Western blot. (Damoiseaux & Cohen, 2006).

Otra técnica utilizada para la detección de ANA es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), en el cual las placas de poliestireno son recubiertas con macerados (principalmente núcleos) de las líneas celulares HEp-2 o HeLa. En este caso, la especificidad es mínima ya que si se obtiene un resultado positivo, no se sabe el o los autoantígenos que están dando la positividad o reactividad. Por el contrario, los patrones obtenidos en células HEp-2 permiten sospechar la especificidad de los ANA. (Shoenfeld, Gershwin & Meroni, 2007). Western blot (EIT) es una técnica para la detección de actividad contra componentes celulares. Es altamente sensible y específica, y su uso está enfocado principalmente a investigación. La detección de ANA mediante EIT permite identificar una gran cantidad de autoantígenos. Sin embargo, su interpretación no es sencilla. Actualmente se están empleando otras técnicas para la detección de ANA como: microinmunoensayos enzimáticos y técnicas luminométricas de detección múltiple, entre otras. (Damoiseaux & Cohen, 2006).

D. Anticuerpos antinucleares en poblaciones sanas

Estudios anteriores han sugerido que no es raro encontrar individuos sanos que son positivos para ANAs; uno de los primeros estudios diseñados con el propósito de evaluar la prevalencia de anticuerpos antinucleares en personas sanas fue el llevado a cabo por Tan, et al. (1997), el cual reportó los resultados del subcomité de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología. En este estudio sueros de 125 personas sanas provenientes de 15 laboratorios distintos fueron analizados. Para esa época se conocía que cierto porcentaje

de personas sanas podían poseer un resultado positivo para anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia pero el dato exacto se desconocía, principalmente debido a que la técnica hasta ese entonces no había sido por completo estandarizada. Para ese entonces una dilución de 1/40 de los sueros era considerada como la apropiada para la realización de los FANA, pero al observar el alto porcentaje de positividad de los sueros de personas sanas (31.7 %) y la baja especificidad de esta dilución (68 %) los llevó a sugerir la utilización de la dilución 1/160 para la realización de los FANA. Dado que los ANA se incluyen en los criterios de clasificación para LES así como en los de la hepatitis autoinmune, el análisis de los tipos de variables que afectan los niveles de ANA sería útil para evitar la clasificación excesiva o deficiente de estas enfermedades.

En un estudio realizado en Nagahama se registraron un total de 9,575 voluntarios japoneses y se cuantificaron sus niveles de ANA mediante inmunofluorescencia indirecta para analizar la positividad de ANA. Se realizaron estudios genéticos utilizando 7,148 de los 9.575 sujetos en donde los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 fueron imputados y se analizaron las asociaciones entre la positividad de ANA y los SNPs o los alelos HLA asociados con SLE. Estudios anteriores demostraron que la positividad de los ANA se asociaron con el sexo femenino, la vejez y el sobrepeso. (Sato, Chan, Ho, Rose, Parks & Cohn, 2012).

Los ANA se encuentran frecuentemente en poblaciones sanas. En un estudio se definió la prevalencia, el patrón y el título de ANA en diferentes grupos de la población mexicana sana, en la que se estudiaron 304 individuos, clasificados en 3 grupos: 104 donantes de sangre, 100 del personal hospitalario del Hospital General del Estado, que incluía médicos, técnicos de laboratorio, enfermeras; y 100 familiares de pacientes diagnosticados con lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide, todos ellos aparentemente sanos en el momento del estudio. Se determinó ANA utilizando microscopía de inmunofluorescencia realizada en células HEp-2, en la que se detectó fluorescencia en 165 muestras de suero (54,3%). El patrón más frecuente fue el moteado (50,3%). La dilución más frecuente fue 1/40 (35,4%), seguida por 1/80 (13,4%), 1/160 (3,2%) y 1/320 (1,3%). Se encontraron resultados positivos de ANA en un título de 1/160 en el 3,2% de sujetos sanos (Marin, Cardiel,

Cornejo, & Viveros, 2009; de Almeida, Elói, Ferreira, Pedrosa, Gradisse, Costa & Figueiredo, 2014; Coople, Giles, Jaskowski, Gardiner, Wilson & Hill, 2012).

Con pacientes que acudieron a donación a la Sede Central de la Cruz Roja Ecuatoriana en la ciudad de Quito-Ecuador, se realizó un estudio epidemiológico, analítico, transversal, en una muestra representativa de 97 donantes de sangre de ambos sexos, se utilizó para la determinación de anticuerpos antinucleares la inmunofluorescencia. De las 97 personas estudiadas, ocho presentaron anticuerpos antinucleares (ANA) que equivale a una prevalencia de 8.2% (IC95% 2.7-13.6%) del total de la muestra, valor que está por debajo del reportado para otras poblaciones, que oscila entre 11 y 22%. La dilución prevalente hallada en esta investigación fue de 1/40, valor que es análogo a la reportada por otras investigaciones similares realizadas tanto en Ecuador como en otros países como Brasil y Estados Unidos de Norteamérica. (Toledo, Sáenz, & Vivar, 2010).

De los individuos del estudio que presentaron anticuerpos antinucleares en su organismo, las mujeres presentaron la concentración más elevada (1/80); este hecho coincide con publicaciones que afirman que las mujeres son las más afectadas con la presencia de anticuerpos antinucleares en relación con los hombres, probablemente debido a que las hormonas sexuales que se encuentran elevadas en las mujeres son las responsables de la alta concentración de ANA y que en algún momento se realzan, de tal manera que puede degenerar en un trastorno autoinmune del tejido conectivo, entre otros. (Cabral, 2002). A pesar de lo mencionado, los anticuerpos antinucleares por sí solos no parecen ser capaces de causar enfermedad autoinmune; sin embargo, el aumento de su prevalencia en el adulto sano podría crear un fenotipo inmunológico de riesgo que no se ha estudiado a profundidad.

E. Utilidad diagnóstica de los anticuerpos antinucleares en enfermedades autoinmunes

La positividad de ANA en un título anormal es uno de los criterios para la clasificación del SLE del Colegio Americano de Reumatología (ACR). Recientemente, el Grupo de Clínicas Colaboradoras del Lupus Sistémico (SLICC) revisó y validó los criterios de clasificación ACR, definiendo como uno de los criterios inmunológicos de LES, la presencia de un

resultado de ANA por encima del valor de referencia de laboratorio. En síndrome de sjögren del 40 a 70% de los pacientes con esta enfermedad, muestran ANA pero el examen no es requisito para el diagnóstico. Los anticuerpos específicos más frecuentemente asociados a esta enfermedad son anti SS-A/Ro y anti SS-B/La, la frecuencia con que se demuestran varía de acuerdo al método empleado, siendo el más sensible el enzimoimmunoensayo. Los ANA se demuestran en 60 a 90% de los pacientes con esclerosis sistémica, pero su presencia no es requisito para el diagnóstico. En la enfermedad mixta del tejido conectivo y la hepatitis autoinmune, la presencia de ANA es parte integral del diagnóstico (Zepeda, 2002). En artritis reumatoide aunque el marcador inmunológico más importante es el FR, hasta el 25% (aunque varía mucho según las series: 12-70%) de estos pacientes presenta anticuerpos antinucleares, especialmente entre los FR positivo o en los que padecen un SS asociado.

En un estudio realizado por Tan, et al. (1997) se informó que el 31,7% de los individuos normales eran ANA positivos a la dilución 1/40, que se redujo a 13,3% a 1/80 y 5,0% a una dilución de 1/160. Dado que el 95% del LES aún era positivo a una dilución de 1/160, elevar el título de corte negativo de 1/40 a 1/160, puede mejorar la distinción entre un resultado de ANA clínicamente significativo y un resultado de ANA positivo que ocurre en un individuo normal. La frecuencia de detección positiva de ANA utilizando este corte fue de 95% en LES, 87% en esclerosis sistémica 74% en Síndrome de Sjögren y 14% en RA.

Un estudio llevado a cabo en Brasil, que incluyó 126 muestras de suero de personas sanas, 136 pacientes con diagnóstico de enfermedad reumática autoinmune y 118 pacientes con otras enfermedades reumáticas, determinó que la frecuencia de positividad de ANA en sujetos sanos fue del 13,2% en una dilución de 1/80. El título anormal de ANA se definió como la dilución de 1/160, la dilución 1/80 tenía una sensibilidad del 87,7% y una especificidad del 67,8%, mientras que la dilución 1/160 tenía una sensibilidad del 82% y una especificidad del 73,7%. La dilución en la que se obtuvo un resultado negativo en el 95% de la población sana correspondió a la dilución de 1/160. Teniendo en cuenta esta dilución como el título anormal y, por tanto, el valor de referencia de los ANA (de Almeida, Elói, Ferreira, Pedrosa, Gradisse, Costa, & Figueiredo, 2014).

La dilución de 1/160 fue la que tuvo el mejor compromiso entre sensibilidad y especificidad. En el estudio de Beck, et al. (2009) fueron analizados por la curva ROC los resultados de ANA de 47 pacientes con SLE y 27 pacientes con otras enfermedades autoinmunes, y también encontró una dilución de 1/160 como el valor de corte óptimo de la prueba. Sin embargo, en ese estudio el uso de dilución de 1/160 el valor de corte se asoció con una reducción significativa en la sensibilidad diagnóstica de ANA para LES.

En una investigación realizada por González, et al. (2011) sugirió la dilución 1/160 como la ideal para determinar ANA, ya que esta dilución tiene el valor predictivo positiva más alto para la presencia de anticuerpos anti-DNA, en comparación con las diluciones más bajas, y sin comprometer la sensibilidad de la prueba para el diagnóstico de LES.

Existe gran variabilidad en la literatura en cuanto a la dilución que se utilizará en la prueba de ANA utilizando microscopía de inmunofluorescencia realizada en células HEp-2, algunos autores sugieren la dilución 1/40 y otros sugieren diluciones de 1/160 y 1/80. Sin embargo, universalmente recomiendan que solo los títulos 1/160 deben considerarse positivos o relevantes desde el punto de vista del diagnóstico, debido a su mayor valor predictivo positivo para enfermedades reumatológicas autoinmunes y para la presencia de autoanticuerpos específicos. Los títulos $\leq 1/80$ se consideran indeterminados, ya que usualmente no tienen significación diagnóstica y no están asociados con la presencia de autoanticuerpos específicos (anti-dsDNA y anti-ENA).

Como los títulos de los ANA son un parámetro importante para la interpretación de los resultados de la prueba, y considerando que los títulos altos son más frecuentes en los pacientes con enfermedades reumatológicas autoinmunes, se calcularon la razón de verosimilitud (LR) específicos de los diferentes títulos. Asimismo se determinó en la población sana, el valor de corte de 1/80 se asoció con LR $+> 5$, lo que sitúa una prueba diagnóstica como muy útil. Sin embargo, sólo a partir de la dilución de 1/160 se obtuvo un LR $+> 10$, considerado como capaz de modificar significativamente la probabilidad post-prueba de la enfermedad. En la población de individuos con otras enfermedades reumáticas,

sólo la dilución de 1/1280 se asoció a un LR $+> 5$. En ambas poblaciones, títulos menores a 1/160 mostraron LR- $<0,2$, considerado muy útil para excluir el diagnóstico de enfermedades reumatológicas autoinmunes. Además, debe enfatizarse que el valor predictivo de los anticuerpos antinucleares está relacionado no sólo con la sensibilidad y con la especificidad, sino también con la estimación previa de la probabilidad de enfermedad, recomendando que los laboratorios que realicen las pruebas de ANA deben informar los resultados en 2 diluciones, incluyendo 1 a 1/160 y 1 a una dilución inferior, preferiblemente a 1/40, y debe proporcionar información sobre el porcentaje de individuos normales que son positivos a estas diluciones.

F. Antecedentes de los ANA en Guatemala

Hasta el momento, se desconoce la prevalencia de los FANA en personas sanas en Guatemala, sin embargo, varios estudios han reportado la prevalencia de los ANA en pacientes con diferentes patologías. El estudio de García, et al. (2012) reportó un 65.6 % de positividad de los ANA en pacientes con LES. Este resultado es diferente al reportado por Herrera (2012) en el cual se reportó un 85% de positividad en los ANA para pacientes con LES. A pesar de la evidente diferencia en la frecuencia de ambos estudios en ninguno se reporta la metodología mediante la cual se realizaron los ANA.

Un estudio retrospectivo llevado a cabo por Jovel, Arreola, & Herrera (2012), el cual fue realizado en el laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt, reportó a 99 pacientes con un resultado positivo para ANA mediante inmunofluorescencia a los cuales se les evaluó el diagnóstico final que presentaron. En este estudio se resaltó que durante el 2011 se solicitaron al laboratorio 1208 FANA, 266 (22 %) fueron positivas. De esas 266 pruebas positivas solamente el 3.74 % presentó positividad a una dilución de 1/160. Realizar diluciones del suero de los pacientes no es un procedimiento rutinario en el laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt, lo cual explicaría el bajo porcentaje de positividad en esta dilución en pacientes con sospecha de EAR.

IV. Justificación

La presencia de los anticuerpos antinucleares forma parte de los criterios diagnósticos de muchas ERA (LES, EMTC, SS y ES), por lo que su adecuada detección es importante para el establecimiento de dichas enfermedades. En la actualidad existen varios métodos para la detección de los ANA (ELISA, aglutinación, quimioluminiscencia e inmunofluorescencia), siendo la inmunofluorescencia con células HEp-2 el estándar de oro de acuerdo a las recomendaciones del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR). Tradicionalmente se ha utilizado una dilución de 1/40 para la realización de los FANA, pero estudios recientes en poblaciones sanas han demostrado una positividad del 30% en los sueros de estas personas en esta dilución. Las últimas recomendaciones de ACR/EULAR establecen que la dilución adecuada para el diagnóstico de una ERA es de 1/160, pero indican que esta dilución debe de ser validada en cada población.

En la actualidad se desconoce la frecuencia de ANA en la población sana guatemalteca, así como la dilución adecuada para la realización de los ANA mediante inmunofluorescencia. Muchos anticuerpos que no han sido asociados a una ERA pueden producir positividad en la prueba a diluciones bajas, por lo que elevar la dilución en la realización de la prueba reflejaría de mejor manera la condición del paciente. Otro de los beneficios de establecer la dilución adecuada es una reducción en los costos del laboratorio al ya no ser necesarias pruebas confirmatorias para el resultado obtenido en los FANA.

V. Objetivos

A. General:

Determinar la frecuencia de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones de sueros de personas sanas guatemaltecas.

B. Específicos:

Determinar la frecuencia de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones de sueros de pacientes que asisten a banco de sangre del Hospital Roosevelt.

Establecer la frecuencia de los patrones encontrados en las muestras positivas.

Establecer la edad promedio y la proporción de sexo en las muestras positivas.

VI. Hipótesis

La dilución 1:160 es la óptima para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes reumatológicas

VII. Materiales y métodos

A. Universo y muestras

1. Universo

Pacientes sanos que asisten a banco de sangre del Hospital Roosevelt.

2. Muestra

Se obtendrán muestras de sangre de 814 personas sanas que asisten a banco de sangre del Hospital Roosevelt.

B. Recursos

1. Humanos

a. Asesor

Lic. Kevin Alexander Ortiz Barrientos.

b. Investigadora

Br. Jordana María Catalan López

2. Institucionales

a. Universidad de San Carlos de Guatemala

b. Dirección General de Investigación DIGI

c. Hospital Roosevelt Guatemala.

d. Centro Universitario Metropolitano (CUM)

C. Materiales

1. Materiales

- Puntas de pipetas de 100-1000 uL
- Puntas de pipetas de 10-100 uL
- Eppendorf de 1.5 mL
- Cubreobjetos
- Cámara de incubación
- Tubos sin anticoagulante
- Portaobjetos FITC QC Slide™ (Microesferas con isotiocianato de fluoresceína).

2. Equipo

- Microscopio de inmunofluorescencia
 - Lámpara de Mercurio
 - Filtro excitador de 495 nm
 - Filtro de emisión de 515 nm
- Pipetas automáticas (10-100 uL y 100-1000 uL)
- Centrifuga
- Congelador a -20 °C.
- Probeta de 250 mL

3. Reactivos

- Láminas impregnadas con células Hep-2000® (Immunoconcepts)
- Conjugado (Anticuerpos anti-IgG humana de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína)
- Buffer de fosfato (0.001 M pH 7.2 +/- 0.2)

- Agua desmineralizada
- Medio de montaje (Glicerol)

D. Métodos

1. Recolección de muestras

- a. Se rotuló adecuadamente el tubo del paciente
- b. Se obtuvo aproximadamente 3 mL de sangre por venopunción aséptica, con tubo vacío estéril.
- c. Se coaguló la sangre a temperatura ambiente (18-24 °C).

2. Separación de suero

- a. Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos.
- b. Con pipeta automática se separó un mínimo de 500 uL de suero del paciente y se colocó en tubo eppendorf estéril.
- c. Se almacenó la muestra a -20 °C hasta su análisis.

3. Preparación del buffer PBS

- a. Se midió 1 L de agua desmineralizada.
- b. Se disolvió 10.2 gramos de buffer de fosfato (0.001 M pH 7.2 +/- 0.2) en el agua desmineralizada y se agitó vigorosamente.

Nota: el buffer puede conservarse de 2-10°C durante 4 semanas

4. Preparación de las diluciones

a. Para la preparación de las diluciones se utilizó la siguiente fórmula:

$$FD = \frac{V_{Mx}}{V_T}$$

Donde,

FD = Factor de dilución (Dilución)

V_{Mx} = Volumen de muestra

V_T = Volumen total

El Volumen total corresponde a:

$$V_T = V_{Mx} + V_{Sol}$$

Donde,

V_{Mx} = Volumen de muestra

V_{sol} = Volumen del solvente (buffer PBS)

b. Preparación de la dilución inicial

Las muestras se inició con una dilución de 1/80 (1 parte de muestra en 79 partes de solvente) utilizando los siguientes volúmenes:

V_{Mx} = 10 uL muestra

V_{sol} = 790 uL buffer de PBS

- Se descongeló y homogenizó mediante inversión las muestras
- Se vertió en un pocillo el V_{sol} .

- Se agregó el V_{Mx} y homogenizó la dilución mediante una serie de succiones (3) con pipeta automática.

c. Preparación de diluciones seriadas

Se realizó una dilución 1/2 a partir de la dilución inicial hasta llegar a una dilución 1/1280.

Para ello se utilizó los siguientes volúmenes:

$V_i = 100$ uL dilución inicial

$V_{sol} = 100$ uL buffer PBS

- Se tomó 100 uL de dilución inicial y se vertió en el pocillo.
- Se agregó 100 uL de buffer PBS y homogenizó mediante una serie de succiones (3) con pipeta automática.
- Se tomó 100 uL de la dilución obtenida en paso anterior y se vertió en pocillo.
- Se agregó 100 uL de buffer PBS y homogenizó mediante una serie de succiones (3) con pipeta automática.
- Se repitió los 2 pasos anteriores 3 veces.

Del procedimiento anterior se obtuvo las siguientes diluciones: 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280.

5. Preparación de láminas con sustrato

- Se sacó los portaobjetos de las bolsas
- Se dispuso los sueros de control en el siguiente orden:

Control negativo pocillo 1

Control Positivo pocillo 2

Control PBS pocillo 3

- Se invirtió el frasco cuentagotas y se apretó hasta que se vió una gota en la punta.
- Se tocó suavemente el pocillo de control con la gota, evitando que la punta del cuentagotas entre en contacto directo con la superficie del portaobjetos.
- Se añadió 1 gota (20-25 uL/pocillo) de cada dilución por pocillo.
- Se colocó el porta objetos en cámara húmeda (Caja de Petri con una toalla de papel humedecida).
- Se incubó durante 30 +/- 5 minutos a temperatura ambiente (18-24 °C).
- Se sacó el portaobjetos de la cámara húmeda.
- Se aclaró con PBS utilizando una pipeta pasteur o jeringa. Para evitar contaminación cruzada se dirigió el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, se inclinó primero hacia los pocillos 1-5 y luego hacia los pocillos 6-10.
- Se dejó reposar el portaobjetos con PBS durante 10-30 minutos. (Una vez utilizada tirar la solución de lavado).
- Se secó el portaobjetos y se sumergió 3-5 veces en agua desmineralizada.
- Se pasó en un papel secante por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.
- Se colocó el portaobjetos en la cámara de incubación.
- Se colocó una gota de conjugado en cada pocillo.
- Se cubrió la cámara y se evitó la exposición a la luz.
- Se incubó durante 30 +/- 5 minutos a temperatura ambiente (18-24 °C).
- Se secó el portaobjetos de la cámara húmeda.
- Se aclaró con PBS utilizando una pipeta pasteur o jeringa. Para evitar contaminación cruzada se dirigió el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, inclinándolo primero hacia los pocillos 1-5 y luego hacia los pocillos 6-10.
- Se dejó reposar el portaobjetos con PBS durante 10-30 minutos. Una vez utilizada se tiró la solución de lavado.
- Se secó el portaobjetos y se sumergió 3-5 veces en agua desmineralizada.
- Se pasó un papel secante por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.
- Se colocó 4-5 gotas de medio de montaje en la línea media de cada portaobjetos.
- Se colocó cubreobjetos con cuidado y se evitó que se formarán burbujas de aire.

VIII. Control de calidad

Para el control de calidad se observó los sueros controles positivo, negativo y PBS colocados en el portaobjetos. El control positivo debe dar una fluorescencia de color verde manzana en los núcleos de las células, con un patrón claramente definido. El control negativo debe dar una fluorescencia inespecífica de color verde mate en el citoplasma y núcleo, pero sin un patrón discernible de tinción nuclear. El control PBS se empleó para observar la tinción inespecífica del reactivo de anticuerpos y no dió fluorescencia verde. Si los controles no se ven como se ha descrito, la prueba no fue considerada válida y se debe repetir.

XI. Observación y reporte de resultados

- Previo a observar la lámina se encendió la fuente de poder y dejó calentar la lámpara de mercurio por al menos 5 minutos.
- Se colocó la lámina en microscopio de inmunofluorescencia con la platina hasta abajo y en el objetivo de menor aumento (10X).
- Se abrió la apertura.
- Se elevó la platina con aumento macrométrico hasta observar portaobjetos.
- Se cambió a objetivo de mayor aumento (40X).
- Se ajustó el campo de visión con aumento micrométrico.
- Se reportó el resultado describiendo los siguientes parámetros:

Patrón: Se utilizó la nomenclatura propuesta por Agmon-Levin y colaboradores (2014).
Intensidad de fluorescencia: 0-4 conforme a Portaobjetos FITC QC Slide™.

De cada célula se observó partes y/o organelas para determinar el patrón de tinción:

Núcleo
Nucléolos
Citoplasma
Aparato mitótico
Células en metafase

Nota: Las muestras fueron observadas por dos personas diferentes. En caso se reporte resultados diferentes por ambos observadores fueron tomados en consideración como negativos para el resultado final.

X. Metodología

a. Diseño del estudio.

Es un estudio observacional analítico transversal.

Se trabajó con personas sanas por cada suero de persona sana se realizó diluciones (1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280) para la detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia.

b. Cálculo de la muestra

La muestra fue calculada utilizando el paquete estadístico EPIDAT 3.1. Utilizando la fórmula para pruebas diagnósticas con grupos emparejados. Los parámetros ingresados en la fórmula fueron los siguientes:

Se estimó una prevalencia del:	50 %
Sensibilidad esperada:	82 % (74.6-88.0)
Especificidad esperada:	73.7 % (64.8-81.4)
Nivel de confianza:	95 %
Potencia:	80 %

Como resultado se obtuvo un $n = 271$ personas con sospecha de ERA en el proyecto y 814 personas sanas para un total de 1084 personas incluidas en el estudio del proyecto de investigación DIGI-USAC 4.8.63.1.03. El presente estudio incluye a las 814 personas sanas como sujetos de estudio.

c. Muestreo y diseño de muestreo

Se realizó el muestreo continuo hasta llegar a la cantidad establecida en personas que asistan al banco de sangre del Hospital Roosevelt posterior a la obtención del consentimiento informado. Las personas sanas fueron pareadas según sexo con los pacientes incluidos en el proyecto de investigación DIGI-USAC 4.8.63.1.03

XI. Criterios de inclusión

Se definió como persona sana a los donadores de sangre que no posean ningún resultado anómalo en las pruebas de laboratorio realizadas rutinariamente por los bancos de sangre y que estén dispuestos a participar en el estudio (Marin et al., 2009).

XII. Consideraciones éticas del estudio

El proceso del consentimiento informado buscó informar a las personas sobre la relevancia social del estudio, el cual permitió conocer la dilución adecuada para la realización de los FANA permitió reducir los costos para las personas por ser necesaria la realización de pruebas adicionales que confirmen el diagnóstico de una enfermedad reumatológica autoinmune. Esta reducción de costos es un beneficio que influyó directamente en las personas que poseen sospecha clínica de padecer estas enfermedades.

El presente estudio fue sometido al comité de ética del Hospital Roosevelt, por lo que se incluye el formato del consentimiento informado solicitado por dicho comité. El proceso del consentimiento informado se realizó de la siguiente forma:

Se abordó al paciente al momento en que este se encuentra en la cola de espera para la donación de sangre sin importar su etnia o lugar de procedencia, momento en el cual se le leyó (explicó) de manera clara y concisa la información contenida en el documento del consentimiento informado (Ver anexo 1). Este documento presenta la información

sobre los objetivos del estudio, los aspectos de confidencialidad de la información brindada y el suero obtenido del paciente y los beneficios que este representa para el paciente y para la comunidad. En ese momento se resolvió cualquier duda que el paciente poseía y de aceptar este participar en el estudio se le solicitó que firme el documento y se le entregó una copia del mismo. Posterior a esto se llenó la ficha de recolección de datos con la información provista por el paciente (ver anexo 2). Se le entregó un tubo de química al paciente el cual se llenó al momento de obtener las muestras para los análisis en el banco de sangre. Posterior a esto se trasladó las muestras al Laboratorio de Inmunología para su procesamiento y almacenamiento hasta su análisis (remitido a la unidad).

XIII. Procesamiento de datos y análisis estadístico:

Se utilizó estadística descriptiva para los resultados obtenidos. Las variables cualitativas se expresó como frecuencias y porcentajes con sus respectivos intervalos de confianza (IC) en cada una de las diluciones trabajadas; la edad fue valorada en media con su desviación estándar. Se estimó el porcentaje de concordancia entre los resultados obtenidos por cada observador y se calculó el valor kappa entre ambos observadores.

Los resultados del presente estudio fueron utilizados en el proyecto de investigación DIGI-USAC 4.8.63.1.03 de la siguiente manera: para el análisis de las variables categóricas se utilizó estadística inferencial mediante Ji cuadrado (X^2) o la prueba F exacta de Fisher para diferencias entre grupos para cada dilución; para la variable edad se utilizó ANOVA para diferencias entre los grupos. Se consideró estadísticamente significativo un $p < .05$. La sensibilidades y especificidades con sus IC del 95% fueron calculadas tomando el porcentaje de positivos de los pacientes del grupo 2 y 3 a los que se llegó a un diagnóstico establecido de ERA según criterios diagnósticos y el porcentaje de los negativos del grupo 1, 2 y 3 (donadores de banco de sangre del presente estudio). La utilidad diagnóstica fue evaluada para cada dilución y para todas las diluciones comparando los pacientes con diagnóstico de ERA del grupo 2 y 3 y las personas sanas del grupo 1, 2 y 3. Los análisis estadísticos fueron realizados en el software EPIDAT.

XIV. Resultados

Se recolectó una muestra de suero de 814 donadores de sangre del Banco de Sangre del Hospital Roosevelt, la mayor parte del grupo estudiado habitaba en el departamento de Guatemala (87.34 %), de los cuales el 5.22 % reportó no presentar ningún grado de escolaridad, el 29.41 % completó la primaria, 20 % completó la secundaria, 33 % completó el diversificado y 12.15 % reportó estar en la universidad o haber completado una carrera universitaria. 17 personas en este grupo reportaron un familiar que presentaba una ERA. De estas 17 personas tres (17.54 %) presentaron anticuerpos antinucleares.

Tabla 1

Datos sociodemográficos y diagnósticos de los grupo sano

	n = 814
Edad, media (DS) ^a	31.63 (8.68)
Sexo, n (%)	
Femenino ^b	776 (95.33)
Masculino ^b	38 (4.67)
Procedencia, n (%)	
Guatemala	711
Otro departamento*	113

*Nota: Sacatepéquez, Escuintla, Alta Verapaz, Petén, Suchitepequez, Zacapa, Chimaltenango, Chiquimula, Huehuetenango, Santa Rosa, El Progreso, Quiché, Baja Verapaz, San Marcos, Jalapa, Sololá, Jutiapa.

^a DS=desviación estándar.

Las muestras fueron observadas por dos especialistas entrenados en la observación de anticuerpos antinucleares. En la tabla 2 se presentan los resultados reportados por cada observador para una dilución 1/80. El valor kappa entre ambos observadores para la positividad de las pruebas es de 0.6217 con un IC 95% de 0.5531-0.6904 con un valor $p < 0.001$ y un acuerdo observado de 88.21%.

Tabla 2

Resultados reportados por cada observador según el grupo estudiado (n = 814)

	Observador 1	Observador 2	Total
Positivo	109	36	145
Negativo	60	609	669
Total	169	645	814

Nota: Los resultados reportados en esta tabla corresponden a una dilución 1/80.

En la tabla 3 se puede observar el valor kappa entre los observadores para los patrones es de 0.5975 con IC 95% de 0.5326-0.6623 con un valor $p < 0.001$ y un acuerdo observado de 86.36%

Tabla 3

Resultados reportados por cada observador según el grupo estudiado (n = 814)

	Observador 1	Observador 2
Patrones		
Moteado	61	57
Homogéneo	14	20
Centromérico	4	4
Nucleolar	25	19
Sugestivo de anti-Ro	1	2
Periférico	0	4
Mixto	0	0
Citoplasmático	61	39
NuMa-1	1	0
MND	2	0

Nota: Los resultados reportados en esta tabla corresponden a una dilución 1/80.

La presencia de anticuerpos antinucleares en las distintas diluciones trabajadas puede observarse en la tabla 4. En donde se puede observar que a medida que aumenta el título, disminuye la positividad de los FANAS.

Tabla 4

Frecuencia de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones

Dilución	Femenino	Masculino	Total ¹ (n = 814)
1/80	108	1	109 (13.39)
1/160	67	0	67 (8.23)
1/320	32	0	32 (3.93)
1/640	18	0	18 (2.21)
1/1280	8	0	8 (0.98)

Nota: Los datos presentados en esta tabla corresponden a los resultados reportados por ambos observadores como positivos.^a frecuencia (porcentaje)

Para la dilución 1/80 se observó que al aumentar la edad, también lo hace la proporción de personas que presentan un ANA positivo (Figura 1). También se observó para la dilución 1/160 (Figura 2), 1/320 (Figura 3) y 1/640 (Figura 4) y para la dilución 1/1280 ya no se observó este fenómeno.

Figura 1

Presencia de ANA en dilución 1/80 según rango de edad (n = 109).

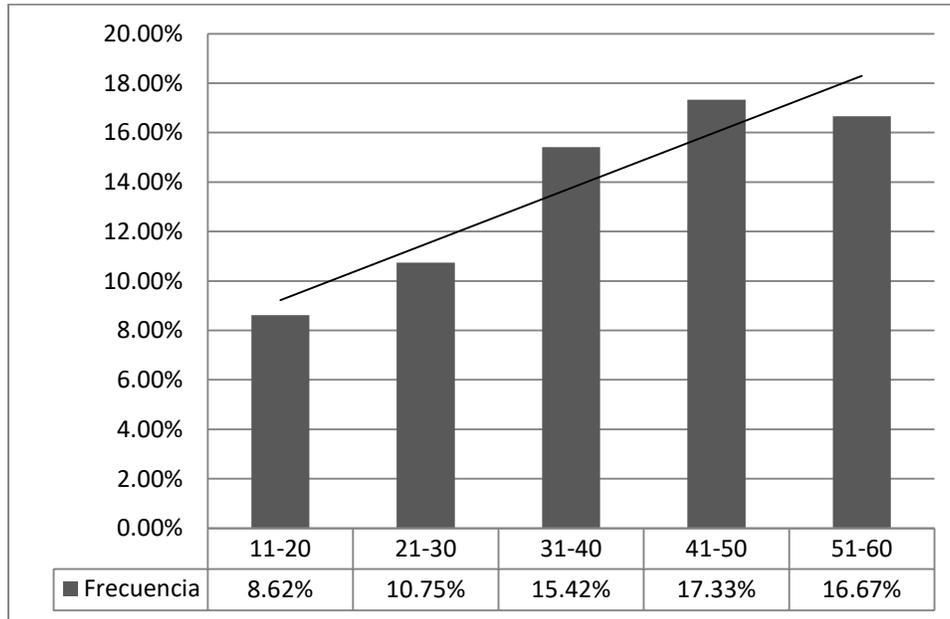


Figura 2

Presencia de ANA en dilución 1/160 según rango de edad de (n = 67).

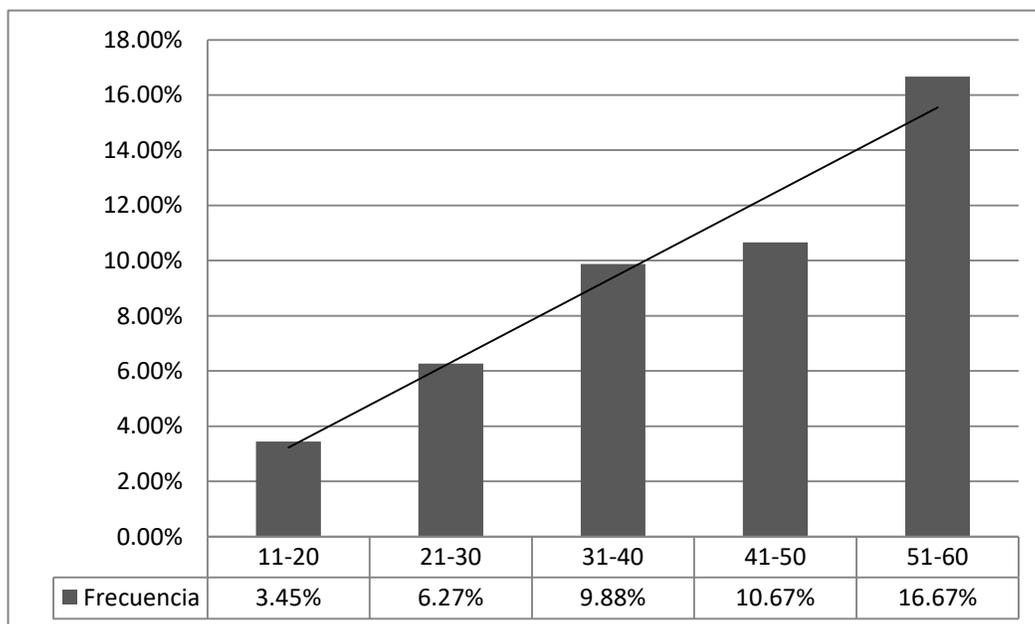


Figura 3

Presencia de ANA en dilución 1/320 según rango de edad de grupo sano (n = 32).

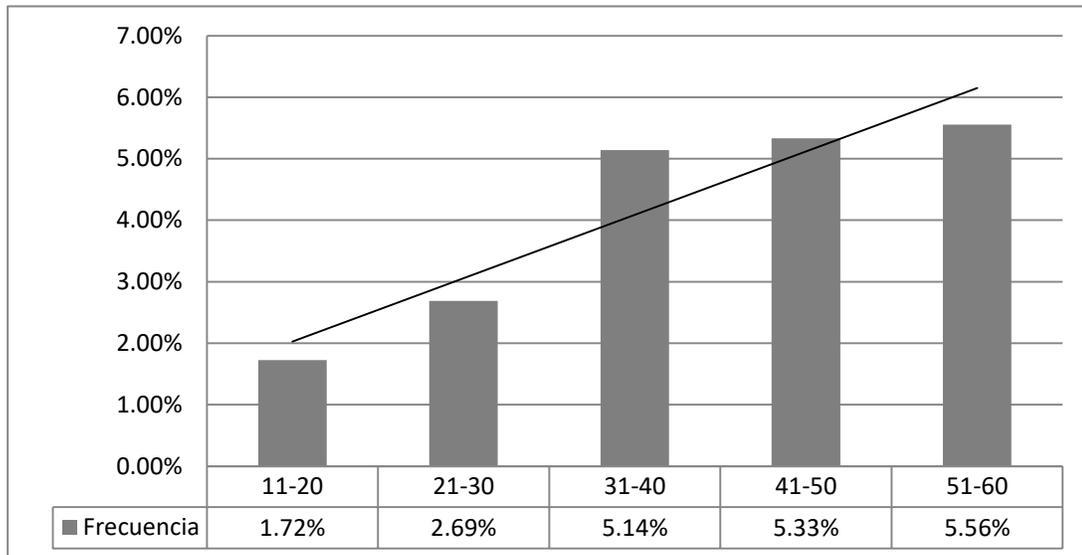
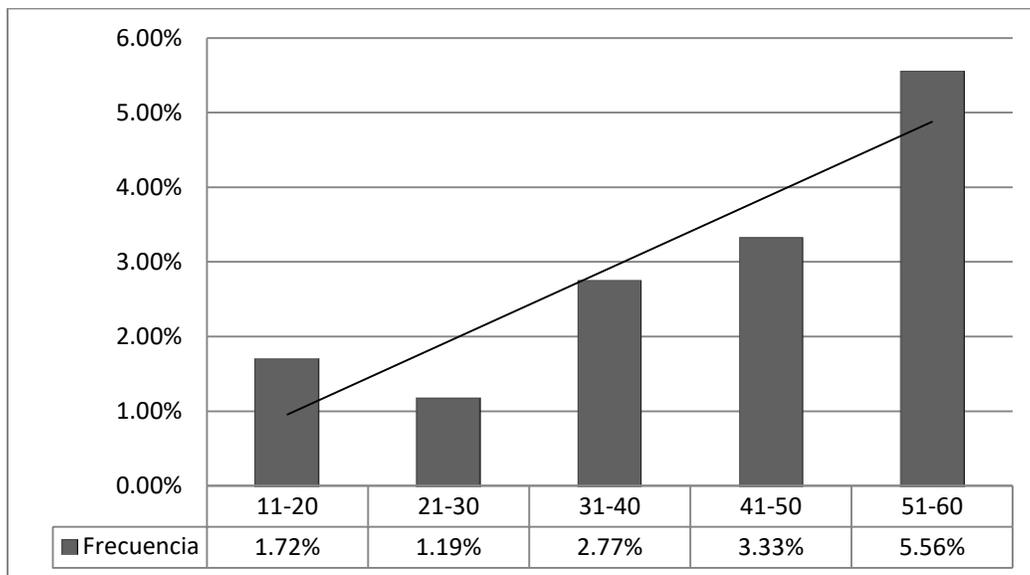


Figura 4

Presencia de ANA en dilución 1/640 según rango de edad de grupo sano (n = 18).



XV. Análisis y discusión de resultados

Las personas con ERA suelen presentar ANA. Se ha demostrado que estos anticuerpos pueden estar presentes hasta 3 años antes del diagnóstico y hasta 2 años antes del inicio de los síntomas (Arbuckle et al., 2003). A pesar de ello la presencia de estos anticuerpos no es prueba de que la persona vaya a desarrollar una ERA. En un estudio llevado a cabo en Japón, se evaluó la presencia de ANA en la población general ($n = 2181$) y a los pacientes que presentaron ANA ($n = 566$) se les evaluó anticuerpos específicos de ERA. De estos 100 pacientes presentaron positividad a estos anticuerpos específicos y solamente 18 llegaron a desarrollar una ERA. Sin embargo el seguimiento de los pacientes con ANA al final de estudio fue de solamente 60 personas (Hayashi et al., 2008).

Las personas incluidas en el presente estudio habitaban mayormente en el departamento de Guatemala, presentaron una edad promedio de 31 años y la mayoría eran del sexo femenino (Tabla 1). Varios estudios han demostrado una mayor prevalencia de ANA en el sexo femenino independientemente del tipo de población que se estudie (con ERA, con sospecha de ERA o personas sanas) (Fernandez et al., 2003; Racoubian et al., 2016; Satoh et al., 2012; Selmi et al., 2016; Tan et al., 1997; Terao et al., 2014). Debido a esta observación algunos autores han propuesto que factores hormonales o propios de la mujeres pueden tener un papel importante en la producción de los ANA (Satoh et al., 2012).

En la tabla 2 se presentan los resultados reportados por cada observador para una dilución 1/80. En 109 muestras se reportaron resultados diferentes por los observadores, la concordancia entre ambos observadores fue analizada con el coeficiente de kappa de Cohen el cual tuvo un valor de 0.6217 con un acuerdo observado de 88.21%, lo cual indica que la concordancia para la positividad entre ambos observadores es considerable (Landis & Koch, 1977). El valor kappa entre observadores para los patrones es de 0.5975 con un acuerdo observado de 86.36%, lo cual indica que la concordancia para los patrones entre los observadores es moderada. (Landis & Koch, 1977). Si se toma en cuenta los intervalos de confianza esto sugiere una concordancia que va de moderada a buena (López, Galparsoro, & Fernández, 1999).

Al igual que otros estudios realizados en donadores de banco de sangre, en el presente estudio el patrón más frecuentemente observado fue el patrón moteado. Es interesante en el presente estudio la elevada cantidad de patrones citoplasmáticos observados en el grupo de estudiado. Este patrón es el segundo en frecuencia lo cual contrasta con estudios previos, en las cuales este patrón ha sido observado en frecuencias bastante bajas (Brito et al., 2014; Fernandez et al., 2003; Marin, Cardiel, Cornejo, & Viveros, 2009; Tan et al., 1997; Yang et al., 2016). Otros patrones que fueron observados en moderada cantidad fueron el nucleolar y el homogéneo.

Los datos presentados reportados en la tabla 4 corresponden a los resultados por ambos observadores como positivos. Se puede observar que a medida que aumenta la dilución también disminuye la frecuencia de positividad de los FANA. Se presentó un porcentaje de positividad de 13.39 % en la dilución 1/80, el cual es bastante similar al reportado por otros autores para donadores de sangre (Brito et al., 2014; Fernández et al., 2003; Marin et al., 2009; Tan et al., 1997) y al reportado por Satoh et al. (2012) y Terao et al. (2014), en la población general. La dilución 1/160 presentó un porcentaje de positividad del 8.23%, la dilución 1/320 de 3.93%, la dilución 1/640 de 2.21% y la 1/1280 de 0.98%.

La recomendación técnica de ACR/EULAR. (Agmon-Levin et al., 2014) establece que la dilución adecuada para la realización de los FANA es 1/160, esto fundamentado en que en la mayor parte de los estudios presentó el percentil 95% a esta dilución. En el presente estudio el grupo estudiado presentó un 8.23% de positividad en la dilución 1/160. Este porcentaje tan alto solo fue observado por Hayashi et al. (2008), en un estudio llevado a cabo en Japón en 2181 personas en el cual se obtuvo un 9.5% de positividad. Este porcentaje puede ser también explicado por la alta frecuencia de personas del sexo femenino en el grupo estudiado, el cual es mayor al reportado por estudios previos (Brito et al., 2014; Fernández et al., 2003; Marin et al., 2009; Satoh et al., 2012; Tan et al., 1997; Terao et al., 2014).

A medida que la edad de las personas aumenta, también lo hace la proporción de personas que presentan ANA para las diluciones de 1/80, 1/160, 1/320 0 y 1/640. En varios estudios se han realizado análisis sobre el efecto de la edad en la positividad de los ANA. Un estudio realizado en Serbia, que evaluó a 10851 personas, concluyó que a medida que aumentaba la edad también lo hacía la presencia de ANA (Racoubian, Zubaid, Shareef, & Almawi, 2016). Sin embargo, esta observación entre la edad de las personas y la presencia de ANA no ha sido reportada en otros estudios. (Fernandez et al., 2003; Hayashi et al., 2008; Selmi et al., 2016; Tan et al., 1997).

XVI. Conclusiones.

Las personas sanas que donaron sangre presentaron ANA en el 13.3 %, 8.23%, 3.93%, 2.21%, 0.98% a una dilución de 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280 respectivamente.

Los patrones más frecuentemente observados en los FANA fueron el moteado, citoplasmático y nucleolar.

El grupo estudiado presentó una edad promedio de 31 años con una mayor proporción de personas del sexo femenino.

Se observó que a medida que se incrementa la edad, aumenta, la frecuencia de ANA en las personas sanas que donaron sangre.

XVII. Recomendaciones

Se recomienda realizar un estudio para la evaluación de otros sustratos como (células Hep2) para la determinación de frecuencia de ANA.

Se recomienda diseñar un estudio que busque relacionar la positividad de ANA y la edad de las personas.

XVII. Referencias

- Agmon-Levin, N., Damoiseaux, J., Kallenberg, C., Sack, U., Witte, T., Herold, M., & Shoenfeld, Y. (2014). International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Annals of the Rheumatic Disease*, 73(1), 17-23.
- Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. A., & Harley, J. B. (2003). Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine*, 349(16), 1526–1533.
- Barile, L., & Xibille, D. (2003). Síndrome de Sjögren. *Revista Mexicana de Reumatología*, 18(2), 137-46.
- Beck, J. (1961). Variations in the morphological patterns of "Autoimmune" nuclear fluorescence. *Lancet*, 1, 1203-1205.
- Beck, S.T., Silva, J.C., Schimit, S., Fleck J., & Santos, R. S. (2009). Taxa de probabilidade como guia de interpretação do FAN-HEp-2 na pesquisa de autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico. *Brasil Patology Medical Laboratory*. 45, 275-283.
- Bloch, D.A., Michel, B.A., & Hunder, G.G. (1990). The American College of Rheumatology criteria for the classification of vasculitis. Patients and methods. *Arthritis Rheumatoid*, 33(8), 1068-1073.
- Cabiedes, J., & Núñez, C. (2010). Anticuerpos antinucleares. *Reumatología Clínica*, 6(4), 224-230.
- Cabral, A. (2002). Influencia de la menopausia en la actividad del lupus eritematoso generalizado. *Revista de Investigación Clínica*, 54, 2.
- Canaris, J., Manowitz, N., Mayor, G., & Ridgway, E. (2000). The Colorado thyroid disease prevalence studies. *Archive Internal. Medical*, 160, 526-534.
- Cañas, C. (2001). Manifestaciones sistémicas del síndrome de Sjögren. *Revista Colombiana de Reumatología*, 8 (2), 51-7.

- Cervera, R., Khamashta, M., Font, J., Sebastiani, G., Gil, A., Lavilla, P., & Doménech, I. (1993). Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and Immunologic Patterns of Disease. Expression in a cohort of 1000 Patients. *Medicine*, 72, 113-124.
- Cid, M. (2000). Tratamiento de las vasculitis sistémicas. *Reumatología*, 16 (4), 131-138.
- Conrad, K., SchoBler, W., Hiepe, F., & Fritzler, M. (2002). Autoantibodies in systemic autoimmune disease. A diagnostic Reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Edi. PABST. 2, 21.
- Coope, S. S., Giles, S. R., Jaskowski, T. D., Gardiner, A. E., Wilson, A. M., & Hill, H. R. (2012). Screening for IgG antinuclear antibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and need for standardization. *Immunopathology*, 137, 825-830.
- Damoiseaux, J., & Cohen, J. (2006). From ANA to ENA: How to proceed? *Revista de Autoinmunidad*, 5, 10-7.
- de Almeida, F., Elói, S. M., Ferreira, G. A., Pedrosa, W., Gradisse, J., Costa, L. C., & Figueiredo, S. P. (2014). Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescenc on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 54(1), 13-20.
- Dellavance, A., de Melo, W., Carvalho, P. L., Pitangueira, C. L., Drugowick, I. C., Rodrigues, S. H., & Coelho, L. E. (2013). Variability in the recognition of distinctive immunofluorescence patterns in different brands of HEp-2 cell slides. *Jornal Brasileiro de Patologia de Medicina de Laboratorio*, 49(3), 182-190.
- De Vlam K, De Keyser, F., Verbruggen, G., Vandenbossche, M., & Vanneuville, B. (1993). Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Clinic Rheumatoly*, 11(4), 393-397.
- Fennell, R. H., Rodnan, G. P., & Vásquez, J. J. (1962). Variability of tissue-localizing properties of serum from patients with different disease state. *Laboratory Investigation*, 11, 24-31.
- Fernandez, S. A. V., Lobo, A. Z. C., Oliveira, Z. N. P. de, Fukumori, L. M. I., Prigo, A. M., & Rivitti, E. A. (2003). Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood dornors. *Revista Do Hospital Das Clínicas*, 58(6), 315-9.

- Friou, G. J. (1957). Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *Journal of Clinical Investigation*, 36, 890-897.
- Friou, G. J. (1958). Clinical application of a test for lupus globulin nucleohistone interaction using fluorescent antibody. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 31, 476-481.
- Friou, G. J. (1958). Identification of the nuclear component of the interaction of lupus erythematosus globulin and nuclei. *Journal of Immunology*, 31, 476-481.
- Friou, G. J. (1958). The significance of the lupus globulin-nucleoprotein reaction. *Annals of Internal Medicine*, 49, 886-894.
- Friou, G. J. (1964). Immunofluorescence and antinuclear antibodies. *Arthritis and Rheumatism*, 7, 161-166.
- Friou, G. J., Finch, S. C., & Detrie, K. D. (1958). Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. *Journal of Immunology*, 80, 224-229.
- Friou, G. J., & Teague, P. O. (1963). Auto-antibody like antinuclear globulin in A/J mice. *Arthritis and Rheumatism*, 7, 773-774.
- Friou, G. J., & Teague, P. O. (1964). Spontaneous autoimmunity in mice: to nucleoprotein strain A/J. *Science*, 143(3612), 1333-1334.
- García, C. O., Ajiataz, N. G., Chapas, R. R., Citalan, J. E., Estrada, C. P., Menéndez, D. R., & Cifuentes, M. E. (2012). Caracterización epidemiológica, clínica y terapéutica de pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Revista Guatemalteca de Reumatología*, 2(1).
- González, D.A., León, A.C., Varela, A.R., García, M.G., Rahola, M. S., & Pérez, M. C. (2011). Autoantibody detection with indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: starting serum dilutions for systemic rheumatic diseases. *Immunology*, 140, 30-5.
- Hahn, N., Eckert, H., & Stewart, J. (1975). Evaluation of cellular substrates for antinuclear antibody determinations. *Journal of Clinical Microbiology*, 2(1), 42-45.
- Hargraves, M. M., Richmond, H., & Morton, R. (1949). Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell and "LE" cell. *Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, 23, 25-28.
- Haserick, J. R., & Bortz, D. W. (1979). Normal bone marrow inclusion phenomena induced by lupus erythematosus plasma. *Journal of Investigative Dermatology*, 13, 47-49.

- Hayashi, N., Koshiha, M., Nishimura, K., Sugiyama, D., Nakamura, T., Morinobu, S., ... Kumagai, S. (2008). Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: Estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Modern Rheumatology*, 18(2), 153–160.
- Herrera, M. (2012). Lupus eritematoso sistémico. Reporte de 50 años de investigación en Guatemala. *Revista de Reumatología de Guatemala*, 2(1).
- Iglesias, A., Siachoque, H., Pons, B., Restrepo, J. F., Quintana, G., & Gómez, A. (2009). Historia de la autoinmunidad. Primera Parte. La inmunología ¿desde dónde y hacia dónde? *Revista Colombiana de Reumatología*, 16(1), 11-31.
- Jovel, A., Arreola, R., & Herrera, M. (2012). *Anticuerpos antinucleares, anticuerpos extraíbles del núcleo y el diagnóstico final*. Hospital Roosevelt, Unidad de Reumatología.
- Lanchmann, P. J., & Kunkel, H. G. (1961). Correlation of antinuclear antibodies an nuclear staining patterns. *Lancet*, 2, 436-437.
- Landis, J.R., & Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174.
- LeRoy, C. (1996). Systemic sclerosis. *Rheumatologic Disease Clinc*, 22 (4), 675-94.
- Lippmann, M., Eckert, H. L., Hahon, N., & Morgan, W. K. (1973). Circulating antinuclear and rheumatoid factors in coal miners. *Annals of Internal Medicine*, 79, 807-811.
- López, A., Galparsoro, D. U., & Fernández, P. (1999). Medidas de concordancia : el índice de Kappa. *Cadernos de Atención Primaria*, 6, 169–171.
- Manns, M. P., Czaja, A. J., Gorham, J. D., Krawitt, E. L., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Vierling, J. M. (2010). Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 51(6), 2193–2213
- Marin, G. G., Cardiel, M. H., Cornejo, H., & Viveros, M. E. (2009). Prevalence od antinuclear antibodies in 3 groups of Healthy individuals. *Journal of Clinical Rheumatology*, 15(7), 325-329.
- Mimura, Y., Ihn, H., & Jinnin, M. (2006). Rheumatoid factor isotypes in mixed connective tissue disease. *Clinic Rheumatoly*, 25, 572.

- Miralles, J. (2001). Tiroides en enfermedades del sistema endocrino y de la nutrición. Ediciones Universidad de Salamanca. p. 59-96.
- Mody, G., & Cardiel, M. (2008). Changes in the management of rheumatoid arthritis in developing countries. *22*, 621-641
- Muna, N. M., Verner, J. L., & Hammond, D. F. (1966). Fluorescent antibody technic as a routine procedure in the diagnosis of lupus erythematosus using stored tissue culture cells. *American Journal of Clinical Pathology*, *45*, 117-121.
- Pozilli, P., & Di Mario, H. (2001). Autoimmune Diabetes not requiring insulin at diagnosis. *Diabetes Care*, *24*, 1460-7
- Racoubian, E., Zubaid, R. M., Shareef, M. A., & Almawi, W. Y. (2016). Prevalence of antinuclear antibodies in healthy Lebanese subjects, 2008–2015: a cross-sectional study involving 10,814 subjects. *Rheumatology International*, *36*(9), 1231–1236.
- Ramos, C., Salcedo, A., & Prieto, R.. (2000) How important is patient education? *14*, 689-703.
- Roa, J. (2005). Avances en la clasificación, inmunopatogenia y tratamiento de la esclerodermia. *Reumatología*, *21*(1), 27-32.
- Roser, M., Labrador, J., Bosch, A. (2001). Etiopatogenia del síndrome de Sjögren. *Revista Española de Medicina Clínica*, *19*(116), 750-5.
- Satoh, M., Chan, E., Ho, L., Rose, K., Parks, C., & Cohn, R., (2012). Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis and Rheumatism*, *64* (23), 19–27.
- Selmi, C., Ceribelli, A., Generali, E., Scirè, C. A., Alborghetti, F., Colloredo, G., ... Meroni, P. L. (2016). Serum antinuclear and extractable nuclear antigen antibody prevalence and associated morbidity and mortality in the general population over 15years. *Autoimmunity Reviews*, *15*(2), 162–166.
- Sneller, M.C., & Fauci, A.S. (1997). Pathogenesis of vasculitis syndromes. *Medicine Clinic North American*, *81*(1), 221-242.
- Sharp, G., Irvin, W., & Tan, E. (1972). Mixed connective tissue disease—an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *52*, 148.
- Shoenfeld, Y., Gershwin, M., & Meroni, P. (2007). Autoantibodies. Elsevier. *2*, 3–6.

- Stenstrom, G., Gottsa, A., Bakhtadze, E., Berger, B., & Sundkvist, G. (2005). Latent Autoimmune Diabetes in Adults: *Definition, Prevalence, Cell Function, and Treatment. Diabetes, 54* (2), 68-72.
- Tan, E., Feltkamp, J., Smolen, S., Dawkins, R., Fritzler, J., Gordon, T., & Koziol, J. (1997). Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthritis and Rheumatism, 40*(9), 1601-1611.
- Terao, C., Ohmura, K., Yamada, R., Kawaguchi, T., Shimizu, M., Tabara, Y., ... Mimori, T. (2014). Association between antinuclear antibodies and the hla class ii locus and heterogeneous characteristics of staining patterns: The nagahama study. *Arthritis and Rheumatology, 66*(12), 3395–3403.
- Toledo, P., Sáenz, K., & Vivar, N. (2010). Valores de referencia de anticuerpos antinucleares en personas aparentemente sanas. Quito-Ecuador. *Revista Mexicana Patología Clínica, 57* (4), 190-195.
- Wayne, P. A. (2008). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. *Approved Guideline, 3*. CLSI document C28-A3.
- Weller, T. H., & Coons, A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 86*, 789-794.
- Wolfe, F. (1996). The natural history of rheumatoid arthritis. *Rheumatology, 44*, 13-22.
- Yang, Z., Ren, Y., Liu, D., Lin, F., & Liang, Y. (2016). Prevalence of systemic autoimmune rheumatic diseases and clinical significance of ANA profile: data from a tertiary hospital in Shanghai, China. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 124*(9), 805–811.
- Zepeda, C. (2002). Anticuerpos antinucleares, una familia diversa. *Revista médica de Honduras, 70*, 189-193.

XIX. Anexos.

Anexo 1.



Unidad de Reumatología e Inmunología
Laboratorio de Inmunología



CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. Introducción

- 1.1. Queremos invitarlo a participar en el estudio titulado **Determinación de la dilución óptima de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia para el diagnóstico de enfermedades reumatológicas autoinmunes**, de manera gratuita y voluntaria.
- 1.2. El presente documento llamado Consentimiento Informado tiene el propósito de informarle sobre las características más importantes del estudio y los procedimientos que se estarán llevando a cabo, así como de los beneficios y riesgos de su participación en el mismo.

2. Antecedentes

- 2.1. La detección de los anticuerpos antinucleares mediante inmunofluorescencia (FANA) en células HEp-2 es de utilidad para la detección de enfermedades reumatológicas autoinmunes (ERA). En la actualidad se desconoce la prevalencia de los anticuerpos antinucleares en personas sanas guatemaltecas, lo cual afecta la precisión diagnóstica de la detección de estos anticuerpos.

3. Propósito del estudio

Este estudio tiene el propósito de establecer la dilución que presente la mejor precisión diagnóstica para la realización de los FANA. Esto permitirá la reducción de los resultados falsos positivos, así como el correcto abordaje de los pacientes por parte del médico tratante. Para llevar a cabo el estudio se necesita obtener una muestra de sangre mediante venopunción. A partir de la obtención de esa muestra, se realizará una prueba de laboratorio donde se podrá determinar la presencia o ausencia de anticuerpos antinucleares.

4. Diseño del estudio

- 4.1. Este estudio es de tipo observacional descriptivo
- 4.2. Duración un año
- 4.3. Se obtendrán muestras de sangre de 253 pacientes con sospecha de ERA y 709 personas sanas.

5. Lo que se le pedirá que haga en su participación

- 5.1. Se obtendrán las muestras realizando una venopunción, para lo cual se le colocará en un lugar cómodo y se le pedirá que extienda el brazo sobre una superficie plana. Se le colocará un torniquete en el brazo y se desinfectará el área donde se puncionará con una jeringa para la obtención de la muestra de sangre. Se obtendrá de 3 a 5 mL de sangre venosa, la cual será procesada en el estudio.
- 5.2. Al momento de la venopunción se registrarán sus datos clínicos y sociodemográficos mediante una entrevista y se obtendrá la muestra de sangre según lo descrito anteriormente.
- 5.3. Las muestras de sangre serán sometidas a un análisis de laboratorio mediante el cual se establecerá la dilución de anticuerpos antinucleares presente en la muestra.

6. Que pacientes pueden participar

Pacientes comprendidos entre las edades de 18-65 años que asistan a la Unidad de Reumatología en el período de junio del 2016 a mayo del 2017 y que estén bajo la sospecha de alguna de las siguientes enfermedades reumatológicas autoinmunes:

- Síndrome de Sjögren
- Lupus Eritematoso Sistémico
- Esclerosis Sistémica
- Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo
- Artritis Reumatoide

Podrán participar como controles sanos aquellas personas que sean aptas como donadores de sangre.

7. Criterios de exclusión

No podrán participar aquellas personas que cursen con enfermedades infecciosas, procesos tumorales o que estén con algún tratamiento que disminuya las defensas.

8. Responsabilidad de las pacientes

8.1. Las personas participantes deberán cumplir con el requisito de brindar la muestra de sangre, en caso contrario serán excluidos del estudio.

9. Riesgos

Los riesgos de la venopunción son moretones, dolor, ardor y quemazón en el sitio de la punción cuando la muestra sea obtenida inadecuadamente. Para evitar esto el personal encargado de la venopunción ha sido capacitado con las herramientas necesarias para realizar la adecuada técnica.

10. Que se hará en caso de efectos adversos complicaciones o molestias

10.1. En caso se presente alguna complicación durante la fase de muestreo el participante serán referido a la emergencia del Hospital Roosevelt para su tratamiento de acuerdo a protocolo establecido.

11. Beneficios

Establecer la dilución óptima para la realización de los anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia en el diagnóstico de las ERA en el laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt permitirá la reducción de los resultados falsos positivos, así como el correcto abordaje de los pacientes por parte del médico tratante. Los costos se reducirán al ya no ser necesaria la realización de pruebas confirmatorias.

12. Participación voluntaria

12.1. Su participación en este estudio es voluntaria y puede negarse a participar o salirse del mismo en el momento que lo desee.

12.2. Negarse a participar en este estudio no afectará en ninguna manera la atención médica en la institución donde es tratada.

13. Compensación por participación

La realización de diluciones de los sueros para la detección de anticuerpos antinucleares es un procedimiento que no se realiza habitualmente. La realización de las diluciones le permite al médico evaluar las de manera más objetiva un resultado positivo de la prueba.

14. Publicación y confidencialidad

El investigador proporcionará los resultados al médico tratante en caso sea necesario y a usted si así lo solicita. Además las muestras podrán conservarse hasta que sean de utilidad en el estudio. Los científicos investigadores no entregarán las muestras a ninguna tercera parte, cumpliendo con esto los principios de privacidad y confidencialidad. Los resultados no serán entregados a terceras personas y su nombre no será divulgado de ninguna forma.

15. A quien debe llamar en caso de complicación o preguntas

15.1. Cualquier duda pueden realizarla con el Investigador Kevin Alexander Ortiz Barrientos al Tel. 47696643

16. Consentimiento del participante

Yo _____ dejo constancia de lo siguiente:

- 16.1.** Que he leído en su totalidad el consentimiento.
- 16.2.** Que he recibido respuesta a todas mis preguntas y dudas.
- 16.3.** Que deseo participar voluntariamente.
- 16.4.** Que me puedo negar o retirarme cuando lo desee.
- 16.5.** Que firmo el consentimiento voluntariamente.
- 16.6.** Y que recibo fotocopia del mismo firmada totalmente.

Nombre: _____ Firma: _____

Identificación: _____ Fecha: _____

En caso de una analfabeta:

Nombre de testigo: _____ Firma: _____

Identificación: _____ Fecha: _____

Nombre de quién obtuvo el consentimiento: _____ Fecha: _____

_____ Firma: _____

Anexo 2.



Unidad de Reumatología e Inmunología
Laboratorio de Inmunología



Correlativo No. _____

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Proyecto “Determinación de la dilución óptima de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia para el diagnóstico de enfermedades reumatológicas autoinmunes”

Información de Contacto

Nombre: _____

Sexo: _____ Edad: _____ Registro Médico: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____ Celular: _____ Correo: _____

Información sociodemográfica

Escolaridad

Ninguna _____ Primaria _____ Secundaria _____

Diversificado _____ Universitario _____

Estrato socioeconómico (de acuerdo a ingreso o a percepción propia???)

Extrema pobreza _____ Pobre _____ Media _____ Alta _____

Parientes con enfermedad autoinmune

si/no _____ ¿Cuál? _____ Grado de consanguinidad _____

Grupo

Control Sano _____ Grupo Retrospectivo _____ Grupo Prospectivo _____

Se encuentra aún vivo (Solo en grupo retrospectivo) _____

Diagnóstico de enfermedad autoinmune _____ Tiempo de padecer ERA _____

Síndrome de Sjögren. _____

Lupus Eritematoso Sistémico. _____

Esclerosis Sistémica. _____

Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo. _____

Artritis Reumatoide. _____

Vasculitis. _____

Otros _____

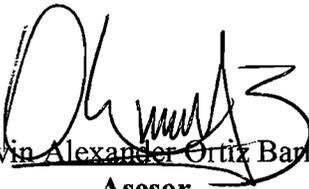
Resultado anticuerpo antinuclear por inmunofluorescencia (positivo/negativo)

1:80 _____ 1:160 _____ 1:320 _____

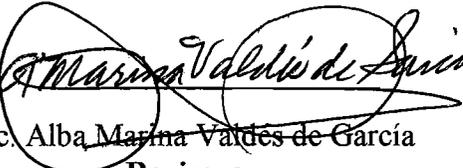
1:640 _____ 1:1280 _____



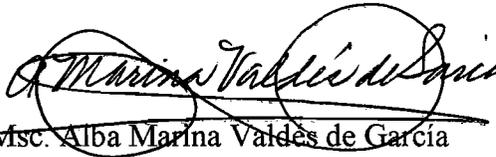
Jordana María Catalán López
Autora



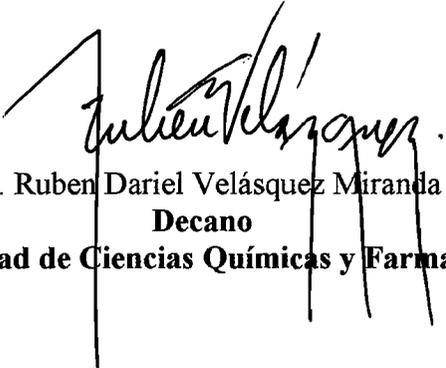
Lic. Kevin Alexander Ortiz Barrientos
Asesor



Msc. Alba Marina Valdés de García
Revisora



Msc. Alba Marina Valdés de García
Directora
Escuela Química Biológica



Dr. Ruben Dariel Velásquez Miranda
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia