

Valores de referencia de anticuerpos antinucleares en personas aparentemente sanas. Quito-Ecuador

Palabras clave: Anticuerpos antinucleares, valores de referencia.

Key words: Antinuclear antibodies, reference values.

Recibido: 30/08/2010
Aceptado: 23/09/2010

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medicgraphic.com/patologiaclinica>

Patricio Toledo,* Klever Sáenz,** Nicolás Vivar*

* Laboratorios Especiales. Net-Lab S.A., Quito-Ecuador.

** Departamento de Calidad. Net-Lab S.A., Quito-Ecuador.

Correspondencia:

Patricio Toledo

Laboratorio Net-Lab S.A.

Calle A N31-145 y Av. Mariana de Jesús. Quito, Ecuador

Telefax: 00593-2-2920911

patricio.toledo@netlab.com.ec

190

Resumen

Las enfermedades autoinmunes son trastornos poco frecuentes en el mundo. La utilización de herramientas como la dosificación de autoanticuerpos en la sangre de los sujetos en los que existe sospecha clínica de enfermedad permite un diagnóstico precoz, evitando que el cuadro autoinmune se agrave. Los anticuerpos antinucleares son autoanticuerpos que se encuentran elevados en personas con trastornos autoinmunes, pero también se hallan en menor monto en personas sanas. Se realizó un estudio epidemiológico, analítico, transversal en 97 donantes de sangre adultos, para establecer los valores de referencia de anticuerpos antinucleares, empleando técnica de inmunofluorescencia indirecta (Hep-2). La prevalencia de expresividad hallada fue de 8.2% ($IC_{95\%}$ 2.7 – 13.6%). De entre quienes expresaron estos anticuerpos, todos mostraron patrón granular fino y, de ellos, 50% lo hizo con títulos de 1:40, 37.5% con 1:20 y 12.5% con títulos de 1:80. La dilución prevalente hallada en este estudio fue 1 en 40, valor que es análogo al reportado en otras investigaciones similares, por lo que se sugiere que sea esta dilución la que se considere como el punto de corte para definir como patológica la expresividad de anticuerpos antinucleares.

Abstract

Autoimmune diseases are rare disorders in the world. The determination of autoantibodies in the blood of the subjects with clinical suspect of this illness allows an early diagnosis that help to prevent future complications. The antinuclear antibodies are highest in people with autoimmune disease but also can be presents in healthy people. A cross sectional study was conducted in 97 healthy blood donors, to establish reference values of antinuclear antibodies using indirect immunofluorescence (Hep2). The prevalence of expressivity was of 8.2% ($IC_{95\%}$ 2.7-13.6%). In all the cases an fine grain pattern was observed and of them 50% with titles 1:40; 37.5% with 1:20 titles and the rest with titles 1:80. The most prevalent expressivity encountered was 1:40. This value is similar at other reports. We conclude that this value must be used like cutoff to define the pathogenic expressivity for antinuclear antibodies.

Introducción

Las enfermedades autoinmunes son trastornos en los cuales el cuerpo humano pierde la facultad de distinguir lo propio de lo extraño. En estos casos, el sistema inmune no reconoce a las células que conforman los tejidos y órganos, produciendo anticuerpos (autoanticuerpos) que dañan las estructuras del organismo. El daño ocasionado puede ser local o sistémico; la piel y el tejido conectivo son habitualmente los más afectados, aunque pueden comprometerse otros tejidos, incluyendo el nervioso y el muscular. La incidencia de enfermedades autoinmunes en el mundo es considerable, ya que más de 3% de la población sufre de este tipo de desórdenes.^{1,2}

Los anticuerpos antinucleares son un gran número de autoanticuerpos dirigidos hacia ciertos componentes del núcleo o del citoplasma celular; la medición de expresividad de estos anticuerpos es muy útil en la investigación de enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico, la esclerodermia, el síndrome de Sjogren, la enfermedad mixta del tejido conectivo, entre otras, siendo usado en unos casos como herramienta diagnóstica y en otros como un indicador pronóstico de la enfermedad.^{3,4}

Un título bajo de anticuerpos antinucleares tiene menor importancia que un título alto. En los pacientes con afecciones autoinmunes del tejido conectivo generalmente se hallan títulos elevados con una concentración variable; además pueden observarse títulos intermedios o bajos en personas mayores, en mujeres gestantes, en pacientes con infecciones crónicas, en sujetos con neoplasias y en individuos sanos.^{5,6}

Diversos son los métodos utilizados en el laboratorio para la determinación de anticuerpos antinucleares (ANA); entre los más practicados se puede citar: inmunofluorescencia indirecta (IFI) que durante muchos años ha sido el más usado por ser una técnica sensible, reproducible y fácil de realizar; Western-Blot, que se fundamenta en el reconoci-

miento de la masa molecular de los autoantígenos a través de un lisado celular separado por electroforesis en un gel de poliacrilamida, ELISA, que se caracteriza por ser un método rápido, sencillo y sensible, basado en la inmovilización del antígeno en un soporte sólido, entre otras.

En cualquier caso, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) continúa siendo la técnica básica de referencia, debido a que aún quedan muchos autoanticuerpos por ser descubiertos y los sustratos tisulares o celulares son los únicos que contienen teóricamente la totalidad de los autoantígenos.^{7,8}

Los valores de referencia para una prueba determinada se basan en los resultados de la misma en una población sana, a partir de los cuales se pueden determinar distribuciones y, por consiguiente, límites e intervalos de referencia; es necesario establecer estos límites para cada población, ya que pueden variar debido a diferentes factores, por ejemplo: genéticos, étnicos, socioeconómicos, entre otros.⁹

Se han venido empleando valores de referencia obtenidos en poblaciones diferentes a la ecuatoriana, en las cuales las condiciones ambientales, raciales y socioeconómicas difieren, por lo cual dichos valores deben ser validados antes de su transferencia.

En el Ecuador, y en particular en Quito, no existe evidencia que sustente el establecimiento de un punto de corte para el caso de la expresividad de los anticuerpos antinucleares en personas adultas, razón por la que el presente estudio busca establecer la prevalencia de expresividad de los anticuerpos antinucleares en población aparentemente sana, con la finalidad de definir entonces el valor «cutoff» que diferencie la normalidad.

191

Material y métodos

Se realizó un estudio epidemiológico, analítico, transversal, en una muestra representativa de 97 donantes de sangre de uno u otro sexo, que acudieron a donación a la Sede Central de la Cruz Roja Ecuatoriana en la ciudad de Quito-Ecuador.

Se utilizó para la determinación de anticuerpos antinucleares la inmunofluorescencia, un inmunoensayo heterogéneo (requiere la separación de las fracciones ligada y libre de la reacción inmunológica antes de la medida de la fluorescencia); se basa en la detección de antígenos presentes en las células mediante un anticuerpo primario que se une al antígeno, luego se aplica un anticuerpo secundario marcado con fluorocromos como isotiocianato de fluoresceína (FITC); para ello se aprovecha la existencia de anticuerpos polyclonales o monoclonales. (IMMCO Diagnostics® Cell Hep2).

Los donantes se sometieron a extracción de 5 mL de sangre venosa por venopunción, para posterior centrifugación (10 minutos a 2,000 revoluciones por minuto, rpm) y separación del suero.

El suero así obtenido fue sometido a una dilución basal con PBS fosfato salino buferado) de 1:20. Las diluciones fueron colocadas sobre los sustratos celulares de células Hep-2 e incubadas por 45 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a lavado con PBS y posterior inoculación sobre las células Hep-2 anti-anticuerpo del tipo IgG marcado con isotiocianato de fluoresceína y nuevamente llevadas a incubación por 45 minutos a la misma temperatura; después de este lapso se limpiaron las células de la inmunoglobulina con PBS. Finalmente, el sustrato celular fue montado con glicerol para lectura en oscuridad con microscopio fluorescente.

Las muestras positivas de esta dilución, fueron sometidas al procedimiento descrito, pero con dilución 1:40; de persistir la positividad, se continuó aumentando la dilución hasta que la señal fluorescente se hubiese perdido.

Los resultados obtenidos se ingresaron en una base de datos de Microsoft Excel, para posterior limpieza y análisis en Spss v15.0. Las prevalencias de expresividad se mostraron en porcentaje, acompañadas de su correspondiente intervalo de confianza al 95% (IC_{95%}).

192

Resultados

Se estudió un total de 97 donantes de sangre adultos, aparentemente sanos, con edad promedio de 31.6 ± 10 años (rango: 18-57 años), de los cuales 50.5% (n = 49) fueron hombres. La edad promedio fue 32.1 + 10.6 años entre los hombres y 31.2 + 9.5 en las mujeres ($p > 0.05$, diferencia no significativa).

La prevalencia encontrada de expresión de anticuerpos antinucleares (ANA) para la muestra general fue de 8.2% (IC_{95%} 2.7-13.6%).

La prevalencia de expresión de ANA desagregada por género, así como por grupo de edad, se presenta en el cuadro I.

De entre los sujetos que expresaron anticuerpos antinucleares, todos mostraron patrón granular fino; de ellos, 50% lo hizo con títulos de 1:40 (figura 1). La distribución de expresividad de ANA por dilución hallada desagregada por edad y sexo se presenta en las figuras 2 y 3. La prevalencia de expresividad, por dilución, se muestra en el cuadro II.

Discusión

Los anticuerpos antinucleares se encuentran en individuos que padecen enfermedades autoinmunes, y en ocasiones en sujetos libres de este tipo

Cuadro I. Prevalencia de expresión de anticuerpos antinucleares (ANA) por género y por grupo de edad.

| Género | Prevalencia % (IC _{95%})* |
|--------------------|-------------------------------------|
| Masculino (n = 49) | 10.2 (1.7 – 18.7) |
| Femenino (n = 48) | 6.3 (NC) |
| Grupo de edad | Prevalencia % (IC _{95%})* |
| < 30 años (n = 53) | 7.5 (0.4 – 14.6) |
| > 30 años (n = 44) | 9.1 (0.6 – 17.7) |

* $p > 0.05$ – No diferencia estadísticamente significativa (t de diferencia de proporciones).

NC = No calculable.

de patologías; por esta razón es importante definir un punto de corte de normalidad que permita discriminar la presencia o no de una condición patológica dada.⁷

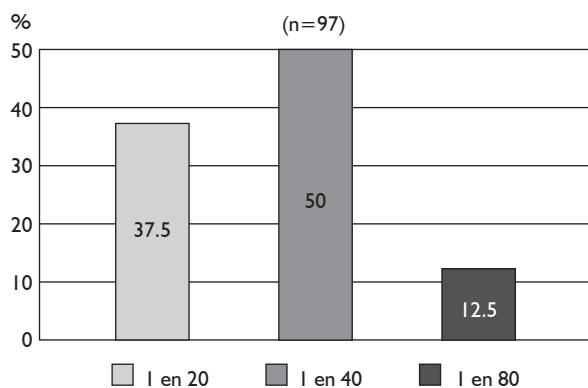


Figura 1. Expresividad de anticuerpos antinucleares (ANA) por dilución evaluada.

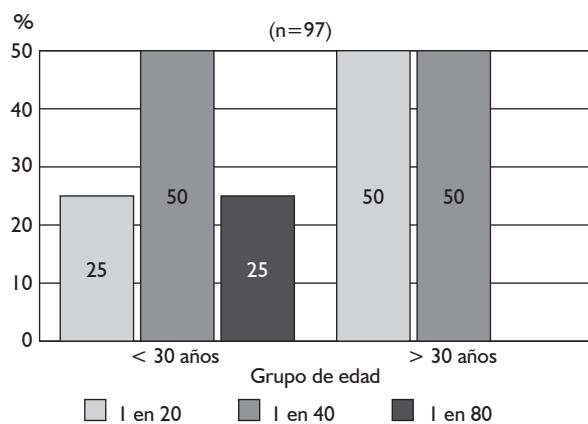


Figura 2. Expresividad de anticuerpos antinucleares (ANA) por dilución y grupo de edad.

Es importante considerar que la prueba de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta se considera un ensayo de sondeo útil debido a su alta sensibilidad y especificidad baja, como en el caso del lupus eritematoso sistémico, en que una prueba positiva con títulos superiores a 1:40 y 1:80 presente un valor predictivo positivo de entre el 15 a 35%, indicando la necesidad de complementar la investigación con las pruebas para otros anticuerpos tales como anti-ADNn, anti-RO, contra-SM, y anti-LA.^{10,11}

En el estudio realizado con las 97 personas estudiadas, ocho presentaron anticuerpos antinucleares (ANA) que equivale a una prevalencia de 8.2% ($IC_{95\%}$ 2.7-13.6%) del total de la muestra, valor que está por debajo del reportado para otras

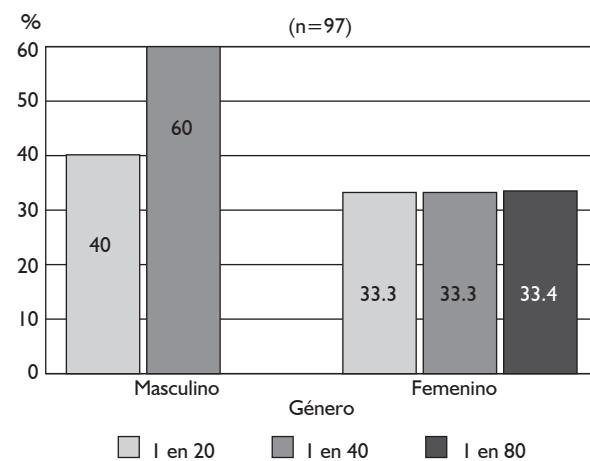


Figura 3. Expresividad de anticuerpos antinucleares (ANA) por dilución y género.

Cuadro II. Prevalencia de grado de expresión de anticuerpos antinucleares (ANA) por género y grupo de edad.

| Género | Prevalencia % ($IC_{95\%}$) | | |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|
| | I:20 | I:40 | I:80 |
| Masculino (n = 49) | 4.3% (nc) | 10.2% (2.1 - 19.5%) | — |
| Femenino (n = 48) | 2.1% (nc) | 4.2% (nc) | 6.3% (nc) |
| Grupo de edad | I:20 | I:40 | I:80 |
| Menor 30 años (n = 53) | 1.9% (nc) | 5.7% (nc) | 7.5% (0.4 - 14.7%) |
| Mayor de 30 años (n = 44) | 4.8% (nc) | 9.1% (0.8 - 18.3%) | — |
| Población total (n = 97) | 3.2% (nc) | 7.5% (2.6 - 12.7) | 8.2% (3 - 14.2) |

poblaciones, que oscila entre 11 y 22%. Debido a que hay pocos estudios de esta clase y la mayoría de ellos se realizaron con población caucásica, que no tiene las mismas características étnicas que las de la población ecuatoriana, es importante establecer un punto de corte propio que permita determinar la cantidad de ANA que se pueda considerar como normal en una población sana y el punto de partida a partir del cual puede sospecharse de la presencia de una patología autoinmune.¹²

La dilución prevalente hallada en esta investigación fue de 1 en 40, valor que es análogo a la reportada por otras investigaciones similares realizadas tanto en nuestro país como en otros como Brasil y Estados Unidos de Norteamérica.^{13,14} La presencia de autoanticuerpos en personas aparentemente sanas puede deberse a varias razones, siendo el papel genético uno de los principales, es decir, que los ancestros de las personas positivas para ANA probablemente también los tenían y éstos fueron heredándolos a su descendencia sin causar manifestación clínica alguna.¹⁵ La totalidad de los casos positivos estudiados mostró un patrón de anticuerpos antinucleares del tipo granular fino, que sugiere la presencia de anticuerpos anti-Ro/SS-A o anti-La/SS-B, siendo anticuerpos dirigidos a ARN de función desconocida ubicado en el citoplasma o en el núcleo y el cual se encuentra asociado a diferentes proteínas de 60 kd y 52 kd.

En cuanto a la distribución de ANA entre categorías de edad, no hubo diferencia estadística que contradijera las observaciones divulgadas en la literatura de una positividad más alta de autoanticuerpos antinucleares en los adultos mayores, como resultado de la pérdida de autocontrol del sistema inmune debido al envejecimiento.¹⁶

De los individuos del estudio que presentaron anticuerpos antinucleares en su organismo, las mujeres presentaron la concentración más elevada (1 en 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.^{1,17}

Al discriminar el título común de anticuerpos antinucleares por género se encontró que en el caso femenino no se pudo determinar con certeza la concentración prevalente, ya que la muestra sometida a investigación no contaba con la suficiente potencia para cumplir con este propósito, lo que se reflejó en la imposibilidad de establecer estadísticamente los correspondientes intervalos de confianza al 95%.

Con base en los hallazgos realizados, el presente estudio sugiere que debería usarse en población adulta residente en la ciudad de Quito como punto de corte de expresividad de anticuerpos antinucleares la dilución 1:40, dilución que fue la predominante en la población estudiada.

Referencias

1. Cabral AR. Influencia de la menopausia en la actividad del lupus eritematoso generalizado. Rev Invest Clin 2002; 54 (2).
2. Barret J. Inmunología. En: Unidad 12, Autoalergia natural y experimental. México: Editorial Americana; 1990.
3. Albiero E, De Auriaga GM. Otros compromisos cardiovasculares frecuentes en la mujer en enfermedades autoinmunes. Disponible en <http://www.fac.org.ar/ccvvc/labe/c287/albier.php> (actualización 30/11/05).
4. Chapel H. Inmunología clínica. México: Editorial McGraw-Hill; 1992.
5. Freedman S. Clinical Immunology. New York: Harper and Row; 1991.
6. Henry J et al. El laboratorio en el diagnóstico clínico. En: Inmunoensayos e inmuquímica. España: Editorial Marban; 2005.
7. Roldán A et al. Anticuerpos antinucleares. Rev Inv Clin. Servicio de Inmunología Hospital Universitario Virgen del Rocío Servicio Andaluz de Salud Sevilla: Editorial Roche; 2000.
8. González de Buitrago JM. Bioquímica clínica. España: McGraw-Hill-Interamericana; 1998.
9. ISO/IEC 15189:2007 Laboratorios Clínicos-Requisitos particulares para la calidad y la competencia 2007.
10. Ronald C. Lupus eritematoso. México: Publicación del Comité de Educación de la Fundación Americana para el Lupus; 2001.
11. Parslow T. Inmunología básica y aplicada. México: McGraw-Hill; 2002.
12. Fernandez SAV, Lobo AZC, Oliveira ZNP et al. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. Rev Hosp Clin 2003; 58 (6): 315-319.

13. Guevara P. Valores de los anticuerpos antinucleares, factor reumatoideo y complemento en personas normales, Universidad de Cuenca, Ecuador. http://www.medicosecuador.com/reumatología_al_dia/rev_vol16_1/valores_de_los_anticuerpos.html
14. Sigal L. Immunology and inflammation. New York: McGraw-Hill; 1994.
15. Abbas A. Inmunología celular y molecular. Madrid: McGraw-Hill; 2004.
16. Weir D. El manual moderno de inmunología. México: McGraw-Hill; 1995.
17. Roitt I. Inmunología. Buenos Aires: Panamericana; 2003.