

**Detección temprana de anticuerpos anti nucleares (ANA): Células HEp-2000®**

Es fácil de entender por qué la frustración es un hallazgo frecuente entre los pacientes con enfermedades autoinmunes.

Autor: Bioq. Patricia Etchevés

La frustración a menudo surge por el prolongado intervalo entre el inicio de los síntomas de enfermedad y el tiempo del diagnóstico formal. Para el paciente con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), no es raro consultar 3 o más médicos durante 4 o más años antes que se establezca el diagnóstico correcto. <sup>(1)</sup> En el Síndrome de Sjögren el tiempo promedio desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico puede ser mayor a 6 años. <sup>(2)</sup> Hay muchos factores que contribuyen a este tiempo prolongado. Diagnosticar correctamente las enfermedades reumáticas sistémicas es, a menudo, comparable a armar un rompecabezas complejo, que requiere del médico el ensamble correcto de varias piezas para formar el cuadro completo. Los síntomas tempranos de estas enfermedades, a menudo, son vagos o no específicos de una enfermedad, por lo tanto no fácilmente interpretables. Muchos síntomas (p.e. fatiga, fiebre, artralgia) se superponen con síntomas de otras enfermedades y pueden involucrar distintos sistemas del organismo. Algunos médicos pueden mirar a los síntomas individualmente y fallar en reconocer que está presente una enfermedad sistémica. <sup>(2)</sup> Por ejemplo, en el Síndrome de Sjögren, el diagnóstico y tratamiento temprano son importantes para prevenir complicaciones. Los síntomas tempranos pueden mimetizarse con aquellos de otras enfermedades, incluyendo lupus, fatiga crónica y artritis reumatoidea. La sequedad que el paciente está evidenciando puede ser fácilmente atribuible a medicamentos tales como antidepresivos o agentes antihipertensivos. Médicos y odontólogos algunas veces pueden tratar cada síntoma individualmente y no reconocer que una enfermedad sistémica está presente. <sup>(2)</sup>

Desde el punto de vista del laboratorio, ningún ensayo individual es diagnóstico para estas enfermedades. Los resultados de ANA por técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), gold standard para detección de ANA, requieren una interpretación subjetiva, y aún cuando son positivos, no discriminan claramente entre individuos enfermos y sanos. Los resultados de anticuerpos anti nDNA y anti ENA pueden ser piezas invaluable del rompecabezas; pero también, tomados en forma individual, no siempre son diagnósticos para estas enfermedades.

**La falla en detectar los autoanticuerpos contribuye a demorar el diagnóstico**

Hay una creciente evidencia que la aparición de autoanticuerpos puede preceder al inicio de la enfermedad, a menudo en varios años. La detección temprana de estos autoanticuerpos puede ofrecer la oportunidad de un diagnóstico y tratamiento temprano, mejorando el tiempo y calidad de vida del paciente. Un estudio reciente en el New England Journal reporta que en promedio, al menos 1 anticuerpo antinuclear estaba presente 3 años antes del diagnóstico clínico de LES (hasta 9,4 años antes; media 3,3 años); y al momento del diagnóstico a menudo estaban presentes 3 autoanticuerpos. <sup>(3)</sup> Con tratamiento adecuado, la acumulación de nuevos autoanticuerpos generalmente se puede prevenir, y la morbi mortalidad asociada a LES es mejor controlada. Los anticuerpos más tempranamente detectados eran anti-SS-A/Ro, anti SS-B/La y anti fosfolípidos (media 3,4 años). Otros anticuerpos antinucleares, precedían al diagnóstico en menos tiempo (anti-DNA, 2,2 años; anti-RNP, anti-Sm, 1,2 años). El riesgo de desarrollar LES aumenta 40 veces cuando los anticuerpos anti-SS-A/Ro y/o anti SS-B/La están presentes. <sup>(3)</sup> Los anticuerpos anti SSA/Ro se encuentran en 60% de pacientes con Síndrome de Sjögren, en 30% de pacientes con LES, en la mayoría de pacientes con lupus cutáneo sub-agudo y en el lupus neonatal. <sup>(4,5)</sup> También se encuentran en el 5-8% de pacientes con artritis reumatoidea. <sup>(5)</sup> En la mayoría de los laboratorios clínicos, el test inicial para la detección de anticuerpos anti nucleares, es la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando células HEp-2. La línea celular HEp-2 es más sensible que el tejido de roedores para la detección de anticuerpos anti SS-A <sup>(6)</sup> y se ha convertido en el sustrato estándar para el test de anticuerpos anti nucleares. Existen numerosos proveedores comerciales de sustrato HEp-2, pero las técnicas de producción son variables y no existe un consenso internacional sobre las condiciones del cultivo, fijación y secado. Mucho de la discusión

sobre la calidad de los sustratos HEp-2 se ha centrado en qué tan bien se preserva el antígeno SS-A. El antígeno SS-A está presente en baja concentración; durante el proceso de fijación puede ocurrir difusión del antígeno desde el núcleo. La fijación con etanol y metanol pueden causar la desnaturalización y el anclado del SS-A al citoplasma. <sup>(7)</sup> Por lo tanto, se ha recomendado la fijación con acetona de las improntas con sustrato HEp-2. <sup>(8)</sup>

Un acercamiento más reciente para mejorar la sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos anti SS-A (ver tabla 1) es el uso de un **sustrato transfectado que sobreexpresa el antígeno humano 60-kDa SSA**. Las **células HEp-2000®** han sido transfectadas con cDNA humano de longitud completa que codifica para la expresión de la proteína de 60 kDa SS-A/Ro. Para la transfección el cDNA se clona en un vector de expresión mamífero bajo el control del promotor inmediatamente temprano del virus Citomegalovirus humano (HCMV). <sup>(9)</sup> Aproximadamente 10 -15% de las células transfectadas van a sobre-expresar el antígeno 60 kDa SS-A/Ro, dando un aumento de título de 41 veces mayor en comparación a las células no transfectadas; resultando así un patrón de tinción diferencial cuando se testean sueros conteniendo autoanticuerpos anti SS-A/Ro. Este patrón único es diagnóstico para autoanticuerpos anti SS-A/Ro; el resto de los autoanticuerpos mostrarán patrones idénticos a los observados utilizando células HEp-2 convencionales como sustrato.

**Tabla 1**

Referencias Bibliográficas	N	IFI ANA + (HEp2000®)	IFI HEp2000®		SS-A+ / ANA total (%)
			Patrón SS-A/ SS-A+ (*)	Otro Patrón / SS-A+ (*)	SS-A+ / ANA + (%)
Bossuyt et al (2000) (10) <sup>(10)</sup>	2427	1394 (57%)	107/22 (88%)	122/122 (100%)	122/2427 (5.03) 122/1394 (8.75)
Bossuyt et al (2004) (11) <sup>(11)</sup>	18371	5217 (28.5%)	295/375 (79%)	375/375(100%)	375/18371 (2.04) 375/5217 (7.18)
Pollock et al (1999) (9) <sup>(12)</sup>	10500	2100 (20%)	145/160 (91%)	159/160 (91%)	160/10500 (1.5) 160/2100 (7.6)
Fritzier et al (2002) <sup>(13)</sup>	2576	969 (37.6%)	101/114 (89%)	114/114(100%)	114/2576 (4.4) 114/969 (11.7)

(\*) CIE; Dot blot; EIA; IDR.

### ¿Cómo se lee e informa este patrón?

Los autoanticuerpos contra SS-A/Ro pueden mostrar un patrón de tinción distintivo en las células transfectadas.

Si se observa este patrón, el mismo se considera como prueba confirmatoria de la presencia de anticuerpos contra el SS-A/Ro. Cuando los anticuerpos anti SS-A/Ro son el único ANA presente, se pueden observar los siguientes patrones:

-Todas las células en interfase muestran un patrón moteado, y del 10% al 20% de las células en hiperexpresión muestran una fuerte tinción en el núcleo y/o nucleolo; algunas células presentarán también tinción en citoplasma. Esto deberá ser reportado como ANA positivo con dos patrones presentes: moteado y el patrón SS-A/Ro. Cuando el patrón distintivo SS-A/Ro está presente es considerado como confirmatorio para la presencia de anticuerpos SS-A/Ro. Pruebas de seguimiento ENA son sugeridas sólo para descartar la presencia de anticuerpos a otros ENA.

-Sólo las células en hiperexpresión muestran tinción en el núcleo, nucleolo y posiblemente en el citoplasma. Las demás células en interfase son negativas. Esto debería ser reportado como ANA positivo, patrón SS-A/Ro presente y considerado como confirmatorio para la presencia de anticuerpos a SS-A/Ro.

La ausencia del patrón distintivo SS-A/Ro no descarta la posible presencia de anticuerpos anti SS-A/Ro. Los estudios han demostrado que aproximadamente el 90% de las muestras que contienen anticuerpos anti SS-A/Ro mostrarán el patrón distintivo, mientras que el restante 10% será un ANA positivo sin mostrar el patrón distintivo SS-A/Ro.

El patrón SS-A/Ro es diferenciable, en el sustrato HEp-2000® de otros patrones ANA positivos:

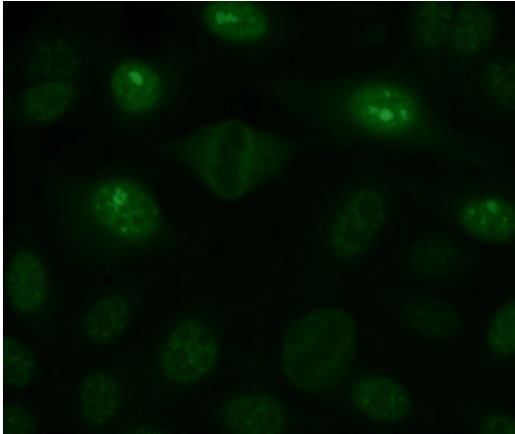


Foto 1

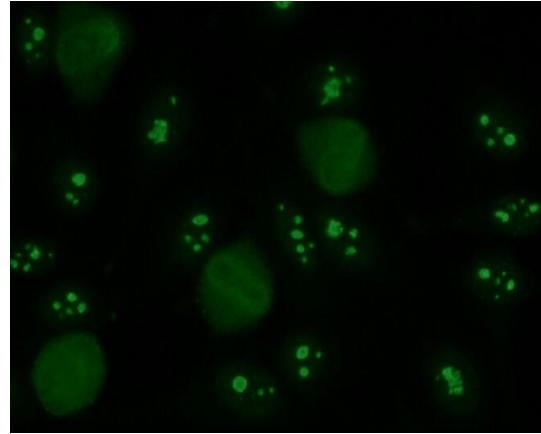


Foto 2

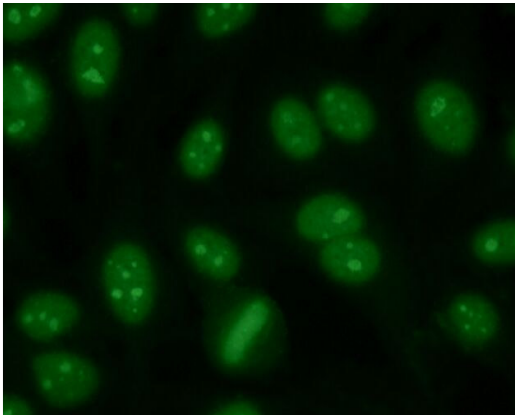


Foto 3

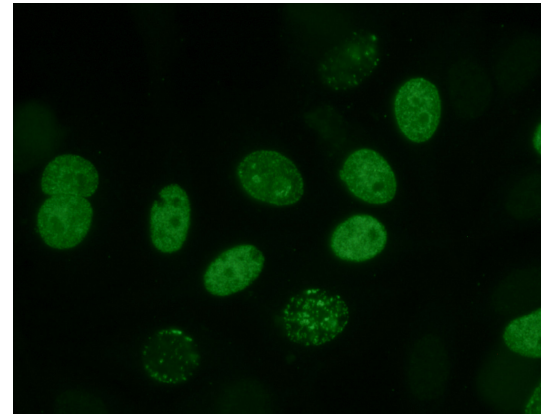


Foto 4

Foto 1: El patrón SS-A/Ro demuestra la tinción distintiva vista en HEp-2000®.

Foto 2: El patrón nucleolar se diferencia fácilmente del SS-A/Ro porque es visto en todas las células y además no tiene tinción moteada del núcleo o citoplasma.

Foto 3: El patrón Scl-70 muestra una combinación de patrones: homogéneo (área cromosómica positiva en células en mitosis), moteado (moteado fino en las células de interfase) y nucleolar (tinción en la zona nucleolar en la mayoría de las células).

Foto 4: El patrón PCNA muestra una tinción moteada dependiente del ciclo de vida de las células parecido al SS-A/Ro, pero el patrón PCNA carece de la tinción nucleolar y citoplasmática que el SS-A/Ro tiene y además la tinción está presente en el 50% de las células y no sólo en el 10 al 20%.

Este nuevo sustrato detecta anticuerpos SS-A/Ro que no han sido identificados por los sustratos HEp-2 estándar ni por otras pruebas inmunológicas, mejorando la sensibilidad de la detección de anticuerpos ANA en comparación con el uso de sustratos convencionales HEp-2. Además la habilidad de detectar los anticuerpos SS-A/Ro a través de una sola prueba genera ahorros para el laboratorio clínico y para el sistema de salud tanto público como privado.

#### Referencias Bibliográficas:

1. Hales, D. When the Body Attacks Itself. Parade Magazine. October 12, 2003.
2. Sjögren's Syndrome Foundation web page, 2003.

3. Arbuckle, M.R., McClain, M.T. et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine* 349(16):1526-1533, 2003.
4. Chan EKL, Andrade LEC. Nuclear antibodies in Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18:551-70.
5. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases. A diagnostic reference. In: Conrad K, Schlossler W, Hiepe F, Fritzler M, eds. *Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity*, Vol. 2. Lengerich: PABST Science Publishers, 2002:166-70.
6. Dore N, Synkowski D, Provost TT. Nuclear antibody determinations in Ro-SSA-positive nuclear-negative lupus and Sjogren's syndrome patients. *J Am Acad Dermatol* 1983;8:611-5.
7. Hollingsworth PN, Pummer SC, Dawkins RL. Nuclear antibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1996:74-90.
8. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the nuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:71-81.
9. Keech C., Mc Cluskey J. and Gordon T. Transfection and Overexpression of the Human 60-kDA Ro/SS-A Autoantigen in HEp-2 CELLS. *Clin Immunology and Immunopathology*, vol.73, N°1, October: 146-151 (1994).
10. Bossuyt X., et al. Screening for autoantibodies to SS-A/Ro by indirect immunofluorescence using HEp-2000® cells. *Ann Clin Biochem* 2000; 37:216-219.
11. Bossuyt X., et al. Detection of Anti-SSA Antibodies by Indirect immunofluorescence. *Clin Chem* 50:12; 2361-2369 (2004).
12. Pollock W., Ban-Hock T. Routine immunofluorescence detection of Ro/SS-A autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60kDA Ro/SS-A. *J Clin Pathol* 1999; 52:684-687.
13. Fritzler M. et al. specificity of autoantibodies to SS-A/Ro on Transfected and Overexpressed Human 60 kDA ro Autoantigen Substrate. *J of Clin Lab Analysis* 16:103-108 (2002).