

## Una mirada al diagnóstico de laboratorio de las enfermedades autoinmunes

### A look to laboratory diagnosis of autoimmune diseases

DrC. René A. Rivero-Jiménez

Instituto de Hematología e Inmunología

---

#### RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes (EA) son provocadas por un daño intrínseco del sistema inmunológico como consecuencia de la pérdida de la autotolerancia que condiciona respuestas anormales frente estructuras propias, lo que genera un daño tisular que perdura en el tiempo. Las causas son multifactoriales y la predisposición genética es poligénica, lo que provoca proteínas diferentes en las células inmunológicamente activas o en las orgánicas. Puesto que el espectro de enfermedades es muy amplio, se clasifican en sistémicas cuando los anticuerpos atacan antígenos presentes en más de un órgano o tejido, y en órgano-específicas cuando el daño involucra a un tejido en particular. Para un diagnóstico correcto de laboratorio de las EA, hay que partir de la identificación de los síntomas clínicos del paciente, su asociación con cada enfermedad y su correspondencia con la detección de los autoanticuerpos. Eso hace que los exámenes de laboratorio sean de gran importancia en la evaluación de los pacientes ya que pueden confirmar el diagnóstico, estimar la gravedad de la enfermedad, ayudar a establecer un pronóstico y ser útiles para dar seguimiento a su evolución. Los componentes del estudio en el laboratorio deben incluir un hemograma completo con recuento diferencial de leucocitos, un panel metabólico completo, marcadores inflamatorios, el estudio de los autoanticuerpos por diversos métodos, las nuevas tecnologías *Multiplex* y la citometría de flujo. En esta mirada al diagnóstico se comentan algunos de los componentes y se abordan elementos de juicio sobre su utilidad clínica.

**Palabras clave:** enfermedades autoinmunes, diagnóstico, laboratorio, autoanticuerpos, inmunofluorescencia, inmunoensayos.

---

## **ABSTRACT**

Autoimmune diseases (AD) are caused by an intrinsic damage of the immune system as a consequence of the loss of autotolerance, conditioning abnormal responses against proper structures giving a lasting in time tissue damage. Causes are multifactorial and the genetic predisposition is polygenic, provoking protein differences in immunological active cells or in organic cells. Although, there is a great diseases spectrum, they have been classified in systemic when antibodies attack antigens present in more than one organ or tissue; and organ-specific when the damage is involving a particular tissue. For a proper laboratory diagnosis of AD, identification of patient's symptoms is the starting point, as well as its association with each disease and the correspondence with autoantibody detection. It makes laboratory exams of great importance in the evaluation of patients, as they can be used to confirm the diagnosis, to estimate severity of the disease, and for the follow up of its evolution. Components of the laboratory study should include a complete hemogram with differential cellular count, a complete metabolic panel, inflammatory markers, the study of auto antibodies by several methods, as well as new *Multiplex* technologies and flow cytometry. In this look to the diagnosis, comments about some components and elements of judge about their clinical usefulness are pointed out.

**Key words:** autoimmune diseases, diagnosis, laboratory, autoantibodies, immunofluorescence, immunoassays.

---

## **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades autoinmunes (EA) son causadas cuando un daño intrínseco del sistema inmunológico, que trae como consecuencia la pérdida de la autotolerancia, condiciona respuestas anormales frente a estructuras propias, lo que genera un daño tisular que perdura en el tiempo.<sup>1</sup> Las causas aun no son totalmente conocidas, pero en su origen se han podido reconocer múltiples factores etiológicos y varios de los genes involucrados están relacionados con el reconocimiento proteico entre las superficies de las membranas celulares del sistema inmunológico y las que forman el resto del organismo. La mayor contribución se debe a los genes del sistema principal de histocompatibilidad (SPH) y hay múltiples ejemplos de asociación entre las EA y determinados antígenos del SPH, ya que estos genes pueden influir en la selección de los linfocitos autorreactivos y en el desarrollo de la autotolerancia. Por otra parte, las influencias ambientales, principalmente causadas por infecciones, pueden predisponer para la autoinmunidad a través de varios mecanismos, entre ellos la estimulación de los coestimuladores en los tejidos y las reacciones cruzadas entre antígenos microbianos y autoantígenos frente a anticuerpos, al convertirlos en auto-anticuerpos (AA). También se han encontrado: la modificación de los receptores, los cambios anatómicos o las radiaciones, como elementos predisponentes.<sup>1,2</sup>

Para su estudio, las EA se han clasificado en dos grandes grupos: las sistémicas y las órgano-específicas, pero en realidad son un amplio espectro de enfermedades y algunas de ellas no podrían definirse como de un tipo o de otro, pues estarían en el centro de este espectro.

Las EA sistémicas se producen cuando los anticuerpos atacan antígenos en más de un órgano o sistema de órganos. Existe un grupo de enfermedades que, a pesar de tener autoanticuerpos para antígenos específicos de algunos órganos, no presentan exclusividad para estos, como en la polimiositis (PM). El mejor ejemplo para este tipo de enfermedades es el lupus eritematoso sistémico (LES), que tiene una mayor frecuencia en las mujeres a la mitad de su vida.<sup>3</sup>

Los llamados síndromes locales o EA órgano-específicas involucran a un tejido en particular, y con frecuencia son de carácter endocrino, por ejemplo, diabetes mellitus tipo 1 (DM1), enfermedad de Addison, y tiroiditis de Hashimoto; dermatológico: pemphigus vulgaris; o hematológico: anemia hemolítica autoinmune. Pero no sólo estos sistemas están afectados.<sup>3</sup>

Se considera que entre 80 y 100 enfermedades se pueden identificar como EA y se calculó que afectaban a unas 300 millones de personas en el mundo en el 2009, siendo el sexo femenino el más implicado con un estimado de entre el 70 - 75 % de los pacientes. Uno de cada 5 habitantes de nuestro planeta tiene o puede tener una EA en el curso de su vida.

El mercado global de las EA alcanzó valores cercanos a los US \$39 billones en 2011 y el pronóstico de crecimiento indica que llegará a los US \$55 billones en 2016, a un ritmo de crecimiento anual del 7,2 %.<sup>4</sup> Si se subdivide en sus tres segmentos: tratamientos farmacológicos, asistencia médica y diagnóstico de laboratorio, los expertos consideran que los tratamientos con medicamentos pasarán de estar valorados en US \$35,8 billones en 2011 a US \$50,6 billones en 2016, por lo que crecerá a un ritmo del 7,2 %. Los tratamientos de otras terapias asistenciales van desde US \$2 billones en 2011 a cerca de US\$2,9 billones en 2016, con un crecimiento del 7 %; y las pruebas de diagnóstico alcanzaron un costo de US\$1,1 billones en 2011 y se espera que para el 2016 asciendan a US\$1,6 billones, para crecer en el 7,1%.<sup>4</sup>

La distribución geográfica de este mercado global en 2011<sup>4</sup> es una muestra de la inequidad que predomina en el mundo actual, con los países ricos encabezando la lista con mayores volúmenes y el mundo subdesarrollado a la zaga. ([Figura](#)).

El diagnóstico de laboratorio de las EA depende de la identificación de los síntomas clínicos del paciente, su asociación con cada enfermedad y su correspondencia con la detección de los AA.<sup>3,5</sup> Por ese motivo, los exámenes de laboratorio son de gran importancia para la evaluación de los pacientes cuando se sospecha una EA.<sup>5</sup> Los resultados pueden confirmar el diagnóstico, estimar la gravedad de la enfermedad, son útiles para dar seguimiento a su evolución y establecer un pronóstico.<sup>3,5</sup>

Los componentes del estudio en el laboratorio deben incluir un hemograma completo con recuento diferencial de leucocitos, un panel metabólico completo, marcadores inflamatorios, el estudio de los AA por diversos métodos, y hasta la citometría de flujo. En esta revisión se comentan algunos de los componentes y se incluyen elementos de juicio sobre su utilidad clínica. Solo la correcta utilización de los resultados de conjunto

con la evaluación clínica y epidemiológica del paciente, darán un mejor entendimiento de la enfermedad inmunológica que padecen.

## **DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO PARA UNA EVALUACIÓN INICIAL**

Las alteraciones más comunes encontradas en las pruebas iniciales de laboratorio, que en gran medida dependen del tipo de EA que afecta al paciente, son:

- La anemia normocítica-normocrómica, la trombocitopenia, la leucopenia, o ambas, por ejemplo, en los pacientes con LES.
- Alteraciones en enzimas órgano-específicas o en procesos metabólicos, como son: los niveles elevados de transaminasas, bilirrubina, proteínas séricas totales en la HA.
- Coagulogramas alterados por incremento del tiempo de tromboplastina activada parcial, tiempo de protrombina, o ambos, como en el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL).
- Hipercalcemia, en el 30 % de los pacientes con sarcoidosis.
- El incremento de los niveles en enzimas musculares como la creatinina cinasa (CK), alanino aminotransferasa (ALT o TGP) y aspartato aminotransferasa (AST o TGO), que se pueden encontrar en las miopatías inflamatorias autoinmunes, como la dermatomiositis, PM y la miositis con cuerpos de inclusión (MCI).
- Los niveles de proteínas séricas sirven para pesquisar los incrementos anormales en los niveles de inmunoglobulinas.<sup>5</sup>
- En los análisis de orina se observan alteraciones asociadas a daño renal, como proteinuria, hematuria o sedimentos activos (leucocitos o eritrocitos), como en la glomerulonefritis y la nefritis intersticial.<sup>6</sup>

Los marcadores inflamatorios, también conocidos como reactantes de fase aguda, son las proteínas séricas que se producen como parte de la respuesta inflamatoria y se consideran marcadores de inflamación. La mayoría se producen en el hígado, como respuestas de estrés. Las citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, y TNF-á, inducen la síntesis de algunos de estos reactantes de fase aguda que incluyen a la proteína C reactiva, el fibrinógeno, y la haptoglobina.<sup>3</sup> Otras proteínas, como la albúmina, no son sensibles a las citocinas inflamatorias para incrementar la síntesis, en su lugar, el estrés crónico (inflamación) da lugar a una menor síntesis y disminución del nivel sérico. Estos marcadores, aunque no son diagnósticos, reflejan las alteraciones que se observan en las EA, las infecciones, las enfermedades malignas, y otras.<sup>7</sup> Entre los más usados están la eritrosedimentación,<sup>8</sup> la proteína C reactiva,<sup>9</sup> la ferritina,<sup>10-12</sup> la ceruloplasmina,<sup>13</sup> el fibrinógeno, la haptoglobina y los niveles de albumina.<sup>3</sup>

### **Los autoanticuerpos**

La presencia de AA en un paciente por si sola no significa el diagnóstico de un EA, pero acompañada de los signos y síntomas asociados ayuda a llegar al diagnóstico definitivo y tienen una importancia crucial. Las pruebas serológicas para detectar AA tienen en

su contra la presencia de AA en personas sanas y en pacientes sin EA conocidas y la existencia de métodos de laboratorio imperfectos.<sup>2</sup>

Las EA órgano-específicas están asociadas con AA específicos contra el principal órgano afectado. Por ejemplo, la tiroglobulina (TGA) y anticuerpos anti-enzima peroxidasa del tiroides (TPO) en la tiroiditis; contra insulina y decarboxilasa ácida glutámica (DAG) en la DM1; anti-mitocondriales en la cirrosis biliar primaria. Para las autoinmunes sistémicas, una variedad de AA son altamente específicos para ciertas enfermedades, como se observa en la [tabla 1](#), [2](#), [3](#)

## EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LOS MÉTODOS DE INMUNODIAGNÓSTICO

El primer método de detección de los anticuerpos antinucleares (ANA) fue la prueba de células LE descrita por Hargraves en 1948.<sup>14</sup> La técnica de inmunofluorescencia (IF) para detectar ANA, que describe subtipos específicos basados en los componentes nucleares y citoplasmáticos, se diseñó en 1957, según refiere Cook.<sup>15</sup>

En los últimos años, los centros de investigación y los laboratorios en la industria han desarrollado variadas técnicas y métodos diferentes para la detección de los anticuerpos, que incluyen los modernos sistemas *Multiplex*,<sup>16</sup> pero el primer método de inmunoensayo se introdujo en 1972<sup>17</sup> y desde entonces se han desarrollado múltiples variantes: simples, estandarizadas y automatizadas.<sup>18</sup>

Los ensayos tradicionales basados en reacciones de hemaglutinación, inmunodifusión, y hasta la IF, se han ido sustituyendo por pruebas más sencillas basadas en técnicas de inmunoelectrotransferencia y ensayos inmunoenzimáticos (EIE) que pueden medir presencia y concentración de los AA individuales en fluidos biológicos, hasta llegar a los recién desarrollados sistemas de inmunoensayos *Multiplex* que permiten la determinación simultánea de diferentes AA, donde un gran número de antígenos se inmovilizan sobre portadores sólidos con arreglos espaciales (planares) o espectrales (basados en microesferas).<sup>19, 20</sup>

La utilidad clínica de los resultados del análisis depende de la calidad del sistema comercial aplicado. El sistema ideal es aquel que combina una alta especificidad con una elevada sensibilidad.<sup>21, 22</sup> El laboratorio de Inmunología se puede enfrentar al dilema de qué técnica escoger, que sea relevante y confiable para detectar a todos los AA clínicamente importantes y que, además, sea eficaz en cuanto a la salida masiva de resultados, eficiente, fácil de usar y poco costosa.<sup>22, 23</sup>

Se recomienda que en cada país exista al menos un laboratorio nacional de referencia, y que tenga la responsabilidad de evaluar cada nueva técnica, y método de prueba, para lo que debe usar sueros de pacientes del país.<sup>3</sup>

En la gerencia de calidad del laboratorio de Inmunología se deben incluir los procedimientos normalizados de operación (PNO) necesarios para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados de las pruebas y las especificaciones de calidad de las pruebas de AA, que debe incluir la fecha de caducidad de los reactivos y sistemas diagnósticos, precisión, valor de corte y su significado, así como la sensibilidad y especificidad diagnósticas con sus valores predictivos y relaciones de similitud. Este proceso necesita de una atención especial basada en la colaboración más estrecha entre los laboratorios participantes y clínicos de experiencia para alcanzar un diagnóstico preciso de los pacientes.<sup>24</sup>

Los ANA son un grupo diverso de anticuerpos que reaccionan contra antígenos nucleares, nucleolares y perinucleares. Estos antígenos representan a los componentes celulares, tales como los ácidos nucleicos, las histonas, la cromatina y las proteínas nucleares y ribonucleares. Estos ANA son los que clásicamente se emplean para el diagnóstico del LES, pero se pueden encontrar en otras EA. Los métodos usados para detectarlos son la IF con diluciones del suero del paciente frente a un substrato adecuado,<sup>25</sup> pero también se emplean los sistemas de EIE.<sup>9</sup> En la tabla 2 se muestra la sensibilidad y especificidad de varias pruebas de ANA en distintas EA.<sup>3</sup>

Las pruebas de escrutinio para la detección de AA se solicitan cada vez más por el área clínica, dada la mayor difusión y comprensión que existe sobre la naturaleza de estos AA, lo que sin dudas incrementa los costos y la necesidad de invertir recursos financieros para adquirirlos. El uso inadecuado de estas herramientas es uno de los principales retos a nivel mundial en el estudio de la autoinmunidad, dando lugar a diagnósticos incorrectos y tratamientos ineficaces.<sup>2</sup>

### La inmunofluorescencia

La técnica de IF indirecta (IFI), que emplea cortes de varios tejidos o la línea celular tumoral (HEp-2) de epiteloma laríngeo humano como fuente antigénica, se utiliza ampliamente para el diagnóstico de EA de muchos laboratorios.<sup>25, 26</sup> En la IFI, los antígenos no definidos son reconocidos por los AA en el suero del paciente y ofrecen determinados patrones que tienen que ser interpretados en relación con su asociación a enfermedades,<sup>27</sup> por lo que el patrón de tinción de una muestra positiva se puede usar para evaluar qué especificidades antigenicas son las más apropiadas para detectarlos. En la tabla 3 se muestran los patrones de IFI para los AA y su relación entre AA específicos y las EA.<sup>2</sup> Por ejemplo, se sabe que la línea celular Hep-2 no tiene una adecuada utilidad para dar IFI positivas cuando se busca la detección de AA contra SS-A/Ro-52 y Jo-1 (histidil-tRNA sintetasa).<sup>3</sup>

Aunque la presencia de varias dianas antigenicas en los cortes de tejidos da lugar a una sensibilidad general excelente de la IFI, los ANA de especificidad no definida se pueden ver en el suero de pacientes con muchas EA, pero también en enfermedades infecciosas y hasta en individuos sanos. La falta de especificidad podría dar lugar a una mala interpretación de los resultados de la IFI, por lo que pierde valor como método de escrutinio.<sup>21</sup>

Además, aunque la IFI es un método sensible, tiene sus limitaciones, como las variaciones en el substrato, su realización manual, la interpretación subjetiva del resultado, poca reproducibilidad y la falta de estandarización; así como el elevado consumo de tiempo para obtener un resultado, lo que implica poca salida de resultados a corto plazo de tiempo y elevación de los costos del laboratorio en gastos de personal.<sup>27</sup>

Para resolver estas limitaciones, recientemente se han desarrollado por la industria, sistemas totalmente automatizados de IFI con patrones de reconocimiento insertados en *software*; pero la estandarización continúa siendo un problema crítico que solo se resolverá mediante la automatización de los sistemas de interpretación de los resultados.<sup>28</sup>

No obstante, el análisis de AA por IFI continua siendo un destacado medio de diagnóstico, aunque para muchos ya está desfasado en tiempo y se le da mayor uso a los inmunoensayos y a los sistemas *Multiplex*.<sup>30</sup>

### **Los ensayos inmunoenzimáticos**

La mayoría de los laboratorios de Inmunología dedicados al estudio de la autoinmunidad usan los EIE como la técnica básica para detectar los AA.<sup>5</sup> El procedimiento principal y central es la captura de los AA del suero de los enfermos por los antígenos inmovilizados. Para ello fueron purificados antígenos importantes de timo de conejo o de bazo humano, o se obtuvieron por técnicas recombinantes.<sup>31-33</sup>

Por ejemplo, la detección de AA por EIE contra los antígenos SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, RNP, Scl-70, PM-Scl y Jo-1 es clínicamente útil en el diagnóstico de las EA sistémicas.

El antígeno SS-A/Ro es una ribonucleoproteína de 60 y 52 kDa. Los AA presentes en el suero del paciente podrían estar dirigidos contra ambos componentes de la proteína. La SS-B/La es una fosfoproteína de 47 kDa asociada con una variedad de pequeños ARNs dentro de las células.

Los antígenos Sm y RNP son un grupo de moléculas heterogéneas consistentes en proteínas que se asocian con RNA pequeños. Los AA contra Sm reaccionan con la proteína B/B` de 28 kDa y la proteína D de 14 kDa. Los AA contra RNP reaccionan más fuertemente con la proteína de 70 kDa y en algunos pacientes con las proteínas C de 32 kDa o 20 kDa.

Debido a la naturaleza compleja de estos antígenos, los métodos usados para su producción para los estuches comerciales son críticos.

El Scl-70 es una proteína de 70 kDa, contiene 765 aminoácidos y actividad topoisomerasa. El Scl-70 recombinante es sensible y tiene una elevada actividad enzimática.<sup>7,8</sup> El PM-Scl es un complejo de 11-16 proteínas con PM variable desde 20 hasta 111 kDa.<sup>15</sup> El Jo-1 es idéntico a la sintetasa histidil-tARN y está presente en el citoplasma. El epitopo principal es la porción amino terminal de la molécula de proteína.

Existen otros antígenos que se han usado en ensayos de detección de AA tanto para las EA órgano específicas como para las sistémicas.

Existe una enorme variabilidad en estas pruebas que provoca diferencias en los resultados, un grado variable de confianza en su utilidad y diagnóstico errado en algunos pacientes.<sup>34</sup> Sin embargo, aunque no existe una solución universal para resolver estos problemas, es posible mejorar la normalización de las técnicas y los métodos. Su normalización se ha convertido en un problema internacional y se trabaja para que, de común acuerdo, fabricantes, proveedores, agencias reguladoras, laboratorios de referencia y las organizaciones médicas se unan en la búsqueda de la calidad. En la práctica, los laboratorios son los responsables de resolver el dilema de elegir el mejor método según su aplicación, en cooperación con sus expertos, los clínicos y los fabricantes.<sup>35</sup>

Los ELISA basados, tanto en antígenos preparados de extractos nucleares de células de líneas tumorales humanas como la HEp-2, o de antígenos nucleares altamente purificados o recombinantes, son las más promisorias, pero se han informado diferencias importantes en términos de positividad al comparar los distintos métodos de EIE disponibles.<sup>32,33</sup>

El aislamiento de autoantígenos de fuentes naturales como el tejido humano, provoca grandes limitaciones en reproducibilidad y pureza. Muchas proteínas están presentes solo en muy pequeñas cantidades y su purificación entraña la eliminación de otras dianas antigénicas potenciales.<sup>26</sup> La especificidad de los ELISA para la detección de AA es fuertemente dependiente de la calidad de los antígenos usados y su similitud en secuencia, conformación y en las modificaciones post-transducción con los antígenos humanos.<sup>36</sup>

Los EIE son ampliamente usados para la identificación de AA específicos para antígenos nucleares o citoplasmáticos de diferentes enfermedades órgano-específicas, como la enfermedad de *Grave*, la cirrosis biliar primaria, la dermatomiositis (DM), o de las sistémicas como esclerosis múltiple (EM), el síndrome de Sjögren (SjS), la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) o la artritis reumatoide (AR).<sup>27, 37</sup>

La ELISA para detectar anticuerpos antinucleares basada en las células HEp-2 (HEp-2 ANA EIA) es un método automatizado con alta reproducibilidad y calibración interna. No obstante, la evaluación de muestras clínicas bien definidas de pacientes con esclerodermia por este método, ofrece menos resultados positivos que la prueba de IFI para ANA.<sup>34, 38</sup>

### **Los inmunoensayos *Multiplex***

Los inmunoensayos *Multiplex* permiten la identificación de múltiples AA frente a un determinante antigénico simple de forma simultánea.

Ensayos basados en la tecnología de *microarray* (microarreglos): los inmunoensayos en tiras de transferencia (*line-blot*) son inmunoensayos *Multiplex* que permiten el análisis paralelo de diferentes tipos de AA. Estos usan antígenos recombinantes casi exclusivamente, inmovilizados en líneas rectas sobre una tira de nylon para pruebas, que cuando se incuban con el suero, los AA presentes se enlanzan a los autoantígenos en la tira y se visualizan a través de un sistema de detección de color, basado en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina.<sup>2</sup>

Los resultados se interpretan mediante la comparación de las intensidades del color de la línea de reacción con la del valor de corte, y algunos trabajos publicados sugieren que un pequeño porcentaje de los resultados negativos en la IFI para ANA puede dar positivo en los ensayos en tiras, especialmente para los anti-SS-A/Ro.<sup>39</sup>

La tecnología de *microarray* planar se desarrolló y aplicó para la detección simultánea de diferentes AA usando el formato de un inmunoensayo tipo *sandwich*. Los diferentes autoantígenos se inmovilizan en un *microarray* junto con las proteínas de control. El ensayo se incuba después con el suero del paciente y los AA reaccionantes se detectan gracias a un segundo anticuerpo marcado. La mayoría de los *microarrays* aplican la quimioluminiscencia o los métodos de fluorescencia para su revelado.<sup>40, 41</sup>

Como alternativa a los *microarray* planares se está aplicando la citometría de flujo para el análisis de inmunoensayos basados en microesferas.<sup>39</sup> Así surgió hace poco un sistema para la detección de ANA por citometría de flujo, con ventajas en cuanto a ahorro de tiempo y de reactivos por su menor costo.<sup>42</sup>

Los sistemas de inmunoensayos con tecnología de micro-esferas y sistemas de detección por citometria de flujo (tecnología xMAP) se están aplicando a la medición de los AA con el uso de microesferas de poliestireno marcadas internamente con diferentes índices de dos fluorocromos diferentes. Cada fluorocromo pude tener cualquiera de los 10 posibles niveles de intensidad de fluorescencia, lo que crea una familia de 100 nichos espectrales en las microesferas, y cada una de las 100 microesferas se pueden diferenciar por la fluorescencia que poseen una vez que los antígenos que corresponden a cada autoanticuerpo se ha unido a ellas y reaccionado con estos. Un rayo laser verde excita a las microesferas y permite cuantificar la intensidad de fluorescencia.<sup>45</sup>

Varias compañías suministran sistemas comerciales basados en la determinación simultánea de AA por citometria de flujo, con buenos resultados en la evaluación de 9 AA diferentes en una misma muestra (ADNdc, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosoma y centrómero B),<sup>16</sup> pero persiste el problema de una verdadera calibración cuantitativa en la detección de AA de pacientes por las diferentes afinidades de estos AA a los antígenos.<sup>44</sup> No obstante, la principal cuestión sigue siendo si los datos cuantitativos que ofrecen los sistemas Multiplex son comparables o no pueden ser comparados con los que aportan los métodos convencionales,<sup>43</sup> aunque algunos consideran que la sensibilidad, confiabilidad y precisión son similares a los sistemas de ELISA.<sup>27, 42</sup>

## **TECNOLOGÍA PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO Y DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

La proteómica clínica ofrece la oportunidad de identificar nuevos biomarcadores para las enfermedades en los líquidos corporales, las células y los tejidos, lo que da lugar a aplicaciones diagnósticas o terapéuticas a través de estos marcadores.<sup>46</sup>

Los *microarrays* proteicos representan una plataforma validada para determinar los niveles de los perfiles proteicos y sus modificaciones, por lo que la tecnología proteómica se ha aplicado al estudio de la respuesta inmunológica contra los antígenos propios y extraños que podrían estar implicados en el desarrollo y la progresión de las EA.<sup>46</sup>

Recientemente se informó que los microARNs (mARNs), que son ARNs mono catenarios endógenos de alrededor de 21 nucleótidos en longitud, son capaces de regular la expresión de genes y de influir en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Se pueden detectar en diferentes fuentes, como tejidos, suero y otros líquidos biológicos, como la saliva. Su importancia es creciente en el estudio de enfermedades malignas y no malignas y cada vez surgen nuevos aportes sobre su comportamiento como biomarcadores de la EA, en particular en el LES<sup>44</sup> y la AR, donde se han informado expresiones anormales. Estas expresiones aberrantes aparecen en diferentes estadios de las EA y están contribuyendo a conocer más sobre la patogénesis de la enfermedad, a monitorear su actividad, los efectos de los tratamientos, y lo que es aún más promisorio, servir de dianas a nuevos procedimientos terapéuticos.<sup>47,48</sup>

## **CONSIDERACIONES FINALES**

Aunque se han logrado avances en la comprensión de la función immunológica, el entendimiento de la desregulación y de la respuesta autoinmune específica permanece limitado. Las alteraciones en los genes que controlan las vías de la autotolerancia son críticas en la patogénesis de estas enfermedades, por lo que la tecnología de *microarray* para el estudio del ADN actualmente disponible, ofrecerá mayor información sobre la fisiopatología de las EA.<sup>49</sup> El uso de la tecnología proteómica aplicada al diagnóstico, en la predicción del curso de la enfermedad, en la evaluación de la terapia más correcta, así como en el monitoreo de su impacto, nos permitirá avances importantes en los procedimientos diagnósticos de las EA.<sup>50</sup> La revolución tecnológica no se detiene y nuestro sistema nacional de salud y la industria biotecnológica y farmacéutica no pueden estar ajenos a estas necesidades en el diagnóstico de laboratorio de las EA y su potencial valor económico y científico-técnico en el mercado global.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. 6 ta. Ed. Madrid: Elsevier Saunders; 2008. pp. 432-9.
2. Salamuniæ I. Laboratory diagnosis of autoimmune diseases new technologies, old dilemas. Biochemia Medica 2010; 20(1):45-56. Disponible en: <http://www.biochemiamedica.com/content/ilza-salamunic-laboratory-diagnosis-autoimmune-diseases -new-technologies-old-dilemmas>. Acceso: 22-7-2012.
3. Castro Ch, Gurley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125 (Suppl 2): S238S247.
4. BCC Research. Global market for autoimmune treatments to grow to \$55 billion by 2016. Disponible en: <http://bccresearch.blogspot.com/2012/05/global-market-for-autoimmune -treatments.html>. Acceso: 22-7-2012.
5. McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 21st ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007; p. 40-1.
6. Seshan SV, Jennette JC. Renal disease in systemic lupus erythematosus with emphasis on classification of lupus glomerulonephritis. Arch Pathol Lab Med. 2009; 133: 233-248.
7. Morehead K. Evaluation of the Patient. B. Laboratory Assessment. (Ed. 13), Primer on the Rheumatic Diseases. New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2008. p. 15-20.
8. Wener MH. Laboratory Tests for Autoimmune Rheumatologic Disorders. 4<sup>th</sup> ed., Educational Review Manual in Rheumatology. New York: Castle Connolly Graduate Medical Publishing, Ltd; 2007. p. 1-42.

9. Lahita RG, Weinstein A. Educational Review Manual in Rheumatology. 4th. Ed. New York, NY: Castle Connolly Graduate Medical Publishing, Ltd.; 2007. pp. 142.
10. Breda L, Nozzi M, de Sanctis S, Chiarelli F. Laboratory tests in the diagnosis and follow-up of pediatric rheumatic diseases: an update. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 40(1): 53-72.
11. Koulouzidis A, Cottier R, Bhat S, Said E, Linaker BD, Saeed AA. A ferritin level > 50 ug/L is frequently consistent with iron deficiency. *Eur J Intern Med*. 2009; 20: 168170.
12. Therul I, Aigner E, Theuri M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*. 2009; 113: 527786.
13. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Ann Rev Nutr*. 2002; 22: 439458.
14. Hargraves M, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow components, the tact cell and the LE cell. *Mayo Clin Proc* 1948; 27: 25-8.
15. Cook L. New Methods for Detection of Anti-nuclear Antibodies. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88: 211-20.
16. Rouquette AM, Desquerelles C, Larosche P. Evaluation of the new multiplexed immunoassays, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 676-81.
17. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-linked anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972; 109: 129-35.
18. Reymond JL, Fluxa VS, Maillard N. Enzyme assays. *Chem Comm*. 2009; 1: 3446.
19. Balboni I, Chan SM, Kattah M, Tenenbaum JD, Butte AJ, Utz PJ. Multiplexed Protein Array Platforms for Analysis of Autoimmune Diseases. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 391-418.
20. Kumble S, Chui L, Lopez-Muedano C, Kumble KD. Microarray ELISA for Autoantibody Screening in Connective Tissue Diseases. *J Clin Diagn Res*. 2012; 6 (2): 200-6.
21. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefroidis G, Westhovens R, Mariën G. Detection of Anti-SSA Antibodies by Indirect Immunofluorescence. *Clin Chem* 2004; 12: 2361-9.
22. Von PAJM, Bast EJEG, Derkken RHWM. Cost-effective detection of non-antidouble-stranded DNA antinuclear antibody specificities in daily clinical practice. *Reumatol* 2006; 45: 629-35.

23. Salamuniæ I, Paukoviæ-Sekuliæ B, Galetoviæ A, Tandara L, Martinoviæ-Kaliterna D. Comparative analysis of multiplex AtheNA Multi-Lyte ANA test system and conventional laboratory methods to detect autoantibodies. *Biochem Med* 2008; 18: 88-98.
24. Sturgess A, Edmonds J. Improving the effectiveness of autoantibody testing in the clinic. *Autoimmun Rev* 2002; 1:273-8.
25. Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, et al. Screening for IgG Antinuclear Autoantibodies by HEp-2 Indirect Fluorescent Antibody Assays and the Need for Standardization. *Am J Clin Pathol*, 2012; 137: 825-30.
26. Hoffman IEA, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of Specific Antinuclear Reactivities in Patients with Negative Anti-nuclear Antibody Immunofluorescence Screening Tests. *Clin Chem* 2002; 48: 2171-6.
27. Stinton LM, Fritzler MJ. A clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. *Autoimmun Rev* 2007; 7: 77-84.
28. Hieman R, Büttner T, Krieger T, Roggenbuck D. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009; 9: 17-22.
29. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev*. 2011;10 (12):801-8.
30. Dahle C, Skogh T, Åberg AK, Jalal A, Olcén P. Methods of choice for diagnostics antinuclear antibody (ANA) screening: Benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. *J Autoimmun* 2004; 22: 241-8.
31. Orton SM, Peace-Brewer A, Schmitz JL, Freeman K, Miller WC, Folds JD. Practical Evaluation of Methods for Detection and Specificity of Autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 297-301.
32. Fenger M, Wiik A, Høter-Madsen M, Lykkegaard JJ, Rozenfeld T, Hansen MS, et al. Detection of Antinuclear Antibodies by Solid-Phase Immunoassays and Immunofluorescence Analysis. *Clin Chem* 2004; 50: 2141-7.
33. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, et al. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a Collaborative study with the biomedical industry. *J Immunol Methods* 1998; 219: 99-107.
34. Dodig S. Interferences in quantitative immunochemical methods. *Biochem Med* 2009; 19: 50-62.
35. Chan EKL, Fritzler MJ, Wiik A, Andrade LEC, Reeves WH, Tincani A, Meroni PL. AutoAbSC. Org-Autoantibody Standardization Committee in 2006. *Autoimmun Rev* 2007; 6:377-80.

36. Shanmugam VK, Swistowski DR, Saddic N, Wang H and Steen VD. Comparison of indirect immunofluorescence and multiplex antinuclear antibody screening in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2011; 30 (10): 1363-8.
37. Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Mouritsen CL, Litwin CM, Hill HR. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 468-73.
38. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Butcher BT, Conn D, Dawkins R, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 455-64.
39. Gonzalez C, Garcia-Berrocal B, Talavan T, Cassas ML, Navajo JA, Gonzalez-Buitrago JM. Clinical evaluation of a microsphere bead-based flow cytometry assay for the simultaneous determination of anti thyroid peroxidase and anti thyroglobulin antibodies. *Clin Biochem* 2005; 38: 966-72.
40. Joos TO, Stoll D, Templin MF. Miniaturised multiplexed immunoassays. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 6: 76-80.
41. Wingren C, Borrebaeck CA. Antibody microarrays: current status and key technological advances. *OMICS* 2006; 10: 411-27.
42. Fritzler MJ. Advances and applications of multiplexed diagnostic technologies in autoimmune diseases. *Lupus* 2006; 15:422-7.
43. Gonzales-Buitrago JM. Multiplexed testing in the autoimmunity laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1169-74.
44. Feng Y, Ke X, Ma R, Chen Y, Hu G, Liu F. Parallel Detection of Autoantibodies with Microarray in Rheumatoid Diseases. *Clin Chem* 2004; 50: 416-22.
45. Seideman J, Peritt D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 microsphere system. *J Immunol Methods* 2002; 267: 165-71.
46. Apweiler R, Aslandis C, Defuel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, et al. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of- application in fluid proteomics. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 724-44.
47. Lu MM, Leng RX, Xu WD and Ye DQ. Is serum microRNA better specific marker for Systemic Lupus Erythematosus? *Clin Rheumatol* 2012; 31 (7), 1143-4.
48. Ceribelli A, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Nahid MdA, Satoh M and Chan EKL. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13 (4): 229. Disponible en: <http://arthritis-research.com/content/13/4/229> Acceso en: 16-10-2012.
49. Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. Proteomics technologies for the Study of Autoimmune Disease. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 885-93.
50. Hueber W, Robinson WH. Proteomic biomarkers for autoimmune disease. *Proteomics* 2006; 6: 4100-5.

Recibido: Septiembre 10, 2012.

Aceptado: Octubre 31, 2012.

**DrC. René A Rivero Jiménez.**

Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, Ciudad de La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268. Fax (537) 644 2334. Email: [rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu)