

# UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

290-F Obstetricia y Ginecología II



## ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN MUJERES ASOCIADA A LA IMPLANTACIÓN DE PRÓTESIS MAMARIAS CON CÁPSULA PERIPROTÉSICA DE SILICONA.

### TESIS DOCTORAL

*presentada por:*

**Antonio Contell Villagrasa**

*Dirigida por:*

Prof. Juan Victoriano Ramírez i Boscà  
Dr. Luis Gregorio Gómez-Cambronero López  
Dr. Marcelino Pérez Bermejo

Valencia, 2015



**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología**

**Facultad de Medicina y Odontología de Valencia**

**Prof. Dr. D. JUAN VICTORIANO RAMÍREZ i BOSCA**

Doctor en Medicina y Profesor Asociado de Obstetricia y Ginecología de la  
Facultad de Medicina de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado "**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN MUJERES ASOCIADA A LA IMPLANTACIÓN DE PRÓTESIS MAMARIAS CON CÁPSULA PERIPROTÉSICA DE SILICONA**" ha sido realizado íntegramente bajo mi dirección, compartida con los Drs. D. LUIS GREGORIO GÓMEZ-CAMBRONERO LÓPEZ y D. MARCELINO PÉREZ BERMEJO, en este departamento por don **ANTONIO CONTELL VILLAGRASA**, licenciado en Medicina y Cirugía, especialista en Bioquímica Clínica, y reúne las condiciones necesarias, para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente para optar al título de Doctor en Medicina.

Valencia, Octubre 2015

Prof. Dr. D. Juan Victoriano Ramírez i Bosca



**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología**

**Facultad de Medicina y Odontología de Valencia**

**Prof. Dr. D. LUIS GREGORIO GÓMEZ-CAMBRONERO**

Doctor en Medicina y Profesor Agregado de Bioquímica Clínica de la Facultad de Enfermería de la Universidad Católica de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado "**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN MUJERES ASOCIADA A LA IMPLANTACIÓN DE PRÓTESIS MAMARIAS CON CÁPSULA PERIPROTÉSICA DE SILICONA**" ha sido realizado íntegramente bajo mi dirección, compartida con los Drs. D. JUAN VICTORIANO RAMÍREZ i BOSCÀ y D. MARCELINO PÉREZ BERMEJO, en este departamento por don **ANTONIO CONTELL VILLAGRASA**, licenciado en Medicina y Cirugía, especialista en Bioquímica Clínica, y reúne las condiciones necesarias, para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente para optar al título de Doctor en Medicina.

Valencia, Octubre 2015

Prof. Dr. D. Luis Gregorio Gómez-Cambronero López



**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología**  
**Facultad de Medicina y Odontología de Valencia**

**Prof. Dr. D. MARCELINO PÉREZ BERMEJO**

Doctor en Bioética y Profesor Agregado de Bioestadística e Investigación de la  
Facultad de Enfermería de la Universidad Católica de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado "**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN MUJERES ASOCIADA A LA IMPLANTACIÓN DE PRÓTESIS MAMARIAS CON CÁPSULA PERIPROTÉSICA DE SILICONA**" ha sido realizado íntegramente bajo mi dirección, compartida con los Drs. D. JUAN VICTORIANO RAMÍREZ i BOSCA y D. LUIS GREGORIO GÓMEZ-CAMBRONERO LÓPEZ, en este departamento por don **ANTONIO CONTELL VILLAGRASA**, licenciado en Medicina y Cirugía, especialista en Bioquímica Clínica, y reúne las condiciones necesarias, para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente para optar al título de Doctor en Medicina.

Valencia, Octubre 2015

Prof. Dr. D. Marcelino Pérez Bermejo





Quiero agradecer a todas las personas que de una forma u otra me han prestado su apoyo en la elaboración de esta Tesis Doctoral:

A mis directores, Dres. D. Juan Victoriano Ramírez i Boscà, D. Luis Gregorio Gómez-Cambronero López y D. Marcelino Pérez Bermejo, por su apoyo, colaboración y empeño en la realización de este proyecto.

Al Dr. D. José Vicente Bori Lizondo, jefe del Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital Clínico de Valencia durante el tiempo en que realicé todo el trabajo de campo. Sin su autorización y ayuda este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. D. José Manuel Caparrós Puchalt, jefe del Laboratorio de Urgencias del citado hospital durante mi época de residente, que con sus consejos y ayuda me hizo amar mi especialidad.

A D. Vicente Navarro Durá, por entonces supervisor del laboratorio, por su colaboración en la gestión y manejo de las muestras.

A todos mis compañeros del laboratorio, adjuntos, residentes, enfermeros, técnicos, auxiliares, administrativos y demás, que durante todo el proceso me mostraron su apoyo.

Al personal de administración del Servicio de P.O.G, entonces y ahora, por su guía y colaboración.



**A Ascensión, mi mujer, por estar siempre a mi lado  
y no dejar de apoyarme  
y  
a Paula y Jonatan, mis hijos, por todos los ratos  
que les he tomado prestados.**



# ÍNDICE



## INTRODUCCIÓN

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.	III
ANEXOS	VII
1. EL SISTEMA INMUNITARIO.	3
1.1. Introducción.	3
1.2. Inmunidad innata y específica.	4
1.3. Características del sistema inmunitario adquirido.	4
1.3.1. Especificidad.	4
1.3.2. Diversidad.	5
1.3.3. Tolerancia.	5
1.3.4. Memoria.	5
1.4. Componentes del sistema inmunitario.	5
1.4.1. Tejido linfoide.	5
1.4.2. Células inmunitarias.	6
1.4.3. Linfocitos B.	6
1.4.4. Linfocitos T.	7
1.4.5. Células NK.	8
1.4.6. Fagocitos mononucleares.	8
1.4.7. Granulocitos.	9
1.4.8. Mastocitos.	9
1.5. Complejo mayor de histocompatibilidad.	9
1.6. Anticuerpos.	12

1.7.	Citoquinas.	13
1.8.	Respuesta inmunitaria	14
2. AUTOANTICUERPOS. IMPORTANCIA CLÍNICA Y MÉTODOS DE DETECCIÓN.		17
2.1.	Introducción.	17
2.2.	Autoinmunidad frente a enfermedad autoinmune.	18
2.3.	Establecimiento del carácter autoinmunitario de una enfermedad.	19
2.3.1.	Evidencia directa.	20
2.3.2.	Evidencia indirecta.	20
2.3.3.	Evidencia circunstancial.	21
2.4.	Anticuerpos contra el núcleo.	22
2.4.1.	Terminología.	22
2.4.2.	Nomenclatura estándar de los autoantígenos.	23
2.4.3.	Características técnicas en los medios de detección.	24
2.4.3.1.	Fijación y permeabilización.	24
2.4.3.2.	Secciones de tejido.	24
2.4.3.3.	Células cultivadas y líneas celulares.	25
2.4.3.4.	Inmunofluorescencia indirecta.	25
2.4.3.5.	Patrones de inmunofluorescencia.	27
2.4.4.	Interpretación clínica y valor diagnóstico.	30
2.5.	Detección de anticuerpos específicos.	33
2.5.1.	Métodos de precipitación.	35
2.5.1.1.	Inmunodifusión doble.	35
2.5.1.2.	Contrainmunolectroforesis.	36



2.5.2.	Aglutinación.	36
2.5.3.	Métodos inmunométricos (ELISA).	38
2.5.4.	Inmunotransferencia o inmunoblot.	41
2.5.5.	Inmunoprecipitación.	42
2.6.	Anticuerpos específicos I. Anticuerpos contra el DNA.	42
2.6.1.	Denominación.	42
2.6.2.	Patogenia.	43
2.6.3.	Utilidad clínica.	44
2.6.4.	Métodos de medida.	44
2.7.	Anticuerpos específicos II. Anticuerpos contra histonas y nucleosomas.	45
2.7.1.	Denominación.	45
2.7.2.	Patogenia.	45
2.7.3.	Utilidad clínica.	46
2.7.4.	Métodos de medida.	47
2.8.	Anticuerpos específicos III. Anticuerpos contra las ribonucleoproteínas.	47
2.8.1.	Anticuerpos contra Ro/SSA.	47
2.8.1.1.	Especificidad antigénica.	47
2.8.1.2.	Patogenia.	48
2.8.1.3.	Utilidad clínica.	48
2.8.1.4.	Métodos de medida.	49
2.8.2.	Anticuerpos contra La/SSB.	49
2.8.2.1.	Especificidad antigénica.	49
2.8.2.2.	Patogenia.	50
2.8.2.3.	Utilidad clínica.	50
2.8.2.4.	Métodos de medida.	50
2.8.3.	Anticuerpos contra UsnRNP.	51

2.8.3.1.	Especificidad antigénica.	51
2.8.3.2.	Patogenia.	52
2.8.3.3.	Utilidad clínica.	52
2.8.3.4.	Métodos de medida.	53
2.9.	Anticuerpos específicos IV. Anticuerpos contra el centrómero.	53
2.9.1.	Especificidad antigénica.	53
2.9.2.	Patogenia.	54
2.9.3.	Utilidad clínica.	54
2.9.4.	Métodos de medida.	54
2.10.	Anticuerpos específicos V. Anticuerpos contra la topoisomerasa I.	55
2.10.1.	Especificidad antigénica.	55
2.10.2.	Patogenia.	55
2.10.3.	Utilidad clínica.	55
2.10.4.	Métodos de medida.	56
2.11.	Anticuerpos específicos VI. Anticuerpos contra el nucleolo.	56
2.11.1.	Especificidad antigénica.	56
2.11.2.	Utilidad clínica.	56
2.11.3.	Métodos de medida.	57
2.12.	Anticuerpos específicos VII. Anticuerpos contra las aminoacil tRNA sintetasas.	57
2.12.1.	Especificidad antigénica.	57
2.12.2.	Patogenia.	57
2.12.3.	Utilidad clínica.	58
2.12.4.	Métodos de medida.	58
2.13.	Anticuerpos contra proteínas circulantes.	58
2.13.1.	Introducción.	58

2.13.2.	Factores reumatoides.	59
2.13.2.1.	Especificidad antigénica.	59
2.13.2.2.	Patogenia y posible función fisiológica.	59
2.13.2.3.	Métodos de medida.	60
2.13.2.4.	Utilidad clínica.	60
2.13.3.	Anticuerpos contra los fosfolípidos.	62
2.13.3.1.	Especificidad antigénica.	63
2.13.3.2.	Anticuerpos contra la cardioplipina.	63
2.13.3.3.	Síndrome antifosfolípido.	63
2.13.3.4.	Patogenia.	64
2.13.3.5.	Métodos de medida.	65
2.13.3.6.	Significado clínico.	65
3.	PRÓTESIS MAMARIAS DE SILICONA.	67
3.1.	Tipos de implantes mamarios de silicona	67
3.1.1.	Implantes de superficie lisa	67
3.1.2.	Implantes de superficie texturada	67
3.1.2.1.	Implante mamario texturado con cápsula de barrera de alto rendimiento relleno de gel de silicona.	67
3.1.2.2.	Implante mamario texturado de silicona relleno de suero salino con válvula de diafragma anterior.	67
3.1.2.3.	Implante mamario texturado relleno de PVP-Hidrogel.	68
3.1.2.4.	Implante mamario texturado monobloc <sup>®</sup> pre-relleno de carboxi-metilcelulosa-hidrogel.	68

4. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL TRABAJO.	70
---------------------------------------	----

5. OBJETIVOS.	72
---------------	----

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

1. SELECCIÓN DE PACIENTES.	75
1.1. Tipo de diseño del estudio.	75
1.2. Criterios de inclusión.	75
1.2.1. Estudio A.	75
1.2.2. Estudio B.	75
1.3. Criterios de exclusión.	76
1.3.1. Estudio A.	76
1.3.2. Estudio B.	76
2. METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS.	77
2.1. Estudio prospectivo.	77
2.2. Estudio retrospectivo.	77
2.3. Toma y procesamiento de las muestras sanguíneas.	77
3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	79
3.1. Parámetros hematológicos generales.	79
3.2. Parámetros bioquímicos generales.	79

3.2.1.	Proteínas totales.	79
3.2.2.	Albumina.	80
3.2.3.	Proteína C reactiva (PCR).	80
3.3.	Parámetros humorales inmunológicos.	80
3.3.1.	Inmunoglobulina A (IgA).	80
3.3.2.	Inmunoglobulina G (IgG).	81
3.3.3.	Inmunoglobulina M (IgM).	81
3.3.4.	Factor del complemento 3 (C3).	81
3.3.5.	Factor del complemento 4 (C4).	82
3.4.	Anticuerpos séricos.	82
3.4.1.	Anticuerpos antinucleares (ANA).	82
3.4.2.	Anticuerpos específicos.	82
3.4.2.1.	Anticuerpos anti-DNA (dsDNA y ssDNA).	83
3.4.2.2.	Otros anticuerpos específicos.	83
3.5.	Anticuerpos contra proteínas circulantes.	83
3.5.1.	Factor reumatoide (FR).	83
3.5.2.	Anticuerpos contra la cardiolipina.	84
3.5.3.	Anticuerpos contra la $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2-GPI).	84
4.	EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS.	86

## **RESULTADOS**

1.	ESTUDIO PROSPECTIVO.	89
----	----------------------	----

1.1.	Descriptivos.	89
1.1.1.	Análisis variables antropométricas y sociodemográficas.	89
1.1.1.1.	Edad, peso.	89
1.1.1.2.	Población de residencia.	91
1.1.1.3.	Estado civil.	92
1.1.1.4.	Profesión.	92
1.1.1.5.	Embarazos.	93
1.1.2.	Análisis variables analíticas.	93
1.1.3.	Análisis variables analíticas dependientes de valores de ANA-/+	94
2.	ESTUDIO RETROSPECTIVO.	95
2.1.	Descriptivos.	95
2.1.1.	Análisis variables antropométricas y sociodemográficas.	95
2.1.1.1.	Edad, peso.	95
2.1.1.2.	Población de residencia.	98
2.1.1.3.	Estado civil.	98
2.1.1.4.	Profesión.	99
2.1.1.5.	Embarazos.	100
2.1.2.	Análisis variables analíticas.	100
	<b>DISCUSIÓN</b>	103
	<b>CONCLUSIONES</b>	109
	Posibles líneas de investigación.	111
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	113

# **ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS**





<b>β2-GPI</b>	β2-glucoproteína I.
<b>Ac</b>	Anticuerpo.
<b>ACA</b>	Anticuerpos contra el centrómero.
<b>Ag</b>	Antígeno.
<b>ANA</b>	Anticuerpos antinucleares.
<b>APC</b>	Células presentadoras de antígenos.
<b>C3</b>	Factor del Complemento 3.
<b>C4</b>	Factor del Complemento 4.
<b>CD</b>	Clase de diferenciación (antígenos marcadores de los grupos de linfocitos T).
<b>CIE</b>	Contrainmunolectroforesis.
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>dsDNA</b>	DNA nativo o de cadena doble.
<b>ELISA</b>	Enzimoimmunoanálisis.
<b>EMTC</b>	Enfermedad mixta del tejido conectivo.
<b>ENA</b>	Anticuerpos frente a proteínas extraíbles del núcleo.
<b>FITC</b>	Fluoresceína isocianato.
<b>FR</b>	Factor reumatoide.
<b>FRs</b>	Factores reumatoides.
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano.
<b>ID</b>	Inmunodifusión doble.
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta.
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina.
<b>IL</b>	Interleuquina.
<b>INFγ</b>	Interferón gamma.
<b>IT</b>	Inmunotransferencia.
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico.
<b>NK</b>	Células asesinas naturales ( <i>natural killer</i> ).
<b>NuMA</b>	Aparato mitótico nuclear.

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular.
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteínas.
<b>sIg</b>	Inmunoglobulinas de superficie.
<b>ssDNA</b>	DNA desnaturalizado o de cadena sencilla.
<b>Tc</b>	Linfocito T citolítico o citotóxico.
<b>TCR</b>	Receptor de células T.
<b>Th</b>	Linfocito T colaborador ( <i>helper</i> ).
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TNF<math>\beta</math></b>	Factor de necrosis tumoral beta.
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferencia.
<b>CV</b>	Coefficiente de variación.

# **ANEXOS**



# 1. PÉRMISOS

JOSE VICENTE BORI LIZONDO, JEFE DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA Y PATOLOGÍA MOLECULAR.  
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO.

Antonio Contell Villagrasa, adscrito al Servicio como F.E.A. de atención continuada, puede utilizar las instalaciones de este Laboratorio para la realización de las pruebas necesarias para el desarrollo de su Tesis Doctoral, presentada y dirigida desde el Departamento de Obstetricia y Ginecología.

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

Dr. J. Vte. Bori

1 de Diciembre de 2004

## 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo Dña.....en  
 calidad de: Paciente                                  Familiar                                  Representante legal  
 (táchese lo que no proceda).

Se me ha explicado por parte del Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Valencia/ Clínica Fontana de Valencia y he entendido conforme a lo estipulado en la declaración de Helsinki que:

- Dentro de mis análisis habituales de sangre, preoperatorio y postoperatorios, se me va a extraer una muestra adicional de sangre venosa para la realización de un estudio hematológico/bioquímico/inmunitario.
- El objeto de dicho estudio es determinar el estado hematológico, bioquímico e inmunitario por la determinación de pruebas de recuento hematológico sanguíneo, niveles séricos de parámetros bioquímicos y pruebas de detección de anticuerpos plasmáticos, como consecuencia de la implantación quirúrgica mamaria.
- Es posible que dicho estudio no se derive en ningún resultado concluyente como consecuencia de la implantación quirúrgica mamaria y debido a la complejidad del proceso patogénico a estudiar.
- Dichos estudios pueden prolongarse durante meses.
- En el caso de detectarse niveles alterados de las pruebas realizadas, deseo ser informada del resultado de los análisis: SI/NO (táchese lo que no proceda).
- El Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Valencia y la Clínica Fontana de Valencia guardarán confidencialidad acerca del resultado del estudio.
- Los componentes de mi sangre, sin identificar como pertenecientes a mi persona, SI/NO (táchese lo que no proceda) se podrán utilizar para realizar otros estudios.
- Quedo en libertad total de abandonar el estudio cuando yo lo considere, sin menoscabo alguno para la continuación de mi asistencia en el Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Valencia / Clínica Fontana de Valencia.
- Leído el documento acepto participar en el estudio.

DNI/NIF:

FIRMA:

FECHA:

### 3. TABLAS

**Tabla 2-2.**  
Prevalencia de ANA en las enfermedades autoinmunes sistémicas.

<b>Enfermedades autoinmunes sistémicas</b>	<b>ANA &gt; 1:320 (%)</b>
Lupus eritematoso sistémico	96
Lupus inducido por fármacos	100
Esclerodermia	97
Síndrome de Sjögren	90
Polimiositis/Dermatomiositis	78

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

**Tabla 2-3.**  
Prevalencia de ANA en personas sanas.

<b>Título</b>	<b>Prevalencia (%)</b>
1:40	32
1:80	13
1:160	5
1:320	<1-3

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

**Tabla 2-4.**

Características de las partículas de ribonucleoproteínas nucleares de pequeño tamaño ricas en uracilo (UsnRNP) de mayor interés clínico.

<b>Partícula</b>	<b>Tamaño</b>	<b>RNA (pb)</b>	<b>RNA polimerasa</b>	<b>Proteínas específicas</b>
		164	II	70 kDa, A, C
U1 snRNP	12 S	188	II	A', B', otras 9
U2 snRNP	17 S	115	II	8 proteínas
U5 snRNP	20 S			150 kDa
U4/U6 snRNP	12 S	145	II	
U4 snRNP		108	III	
U6 snRNP				

pb = pares de bases, U4 snRNP y U6 snRNP se unen formando una única partícula U4/U6 snRNP. Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

**Tabla 2-5.**

Presencia de factor reumatoide en las enfermedades reumáticas.

<b>Enfermedad</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Artritis reumatoide	50-90
LES	15-35
Síndrome de Sjögren	75-95
Esclerosis sistémica	20-30
Polimiositis/Dermatomiositis	5-10
EMTC	50-60

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.



**Tabla 2-6.**  
Factor reumatoide elevado en enfermedades no reumáticas.

<b>Enfermedad</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Edad superior a los 70 años	10-25
Infecciones	
• Endocarditis bacteriana	25-50
• Hepáticas	15-40
• Tuberculosis	8
• Sífilis	13
• Parásitos	20-90
• Lepra	5-60
• Víricas	15-65
Enfermedades pulmonares	
• Sarcoidosis	3-33
• Fibrosis pulmonar intersticial	10-50
• Silicosis	30-50
• Asbestosis	30
Otras	
• Cirrosis biliar primaria	47-70
• Cáncer	5-25

Extraído de “Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos”, Buitrago JM, 2000.

**Tabla 2-7.**  
Principales manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido.

<b>Vasculares:</b>	Trombosis venosa y arterial.
<b>Neurológicas:</b>	Ictus, neuropatía periférica, corea, ataque isquémicos transitorios.
<b>Obstétricas:</b>	Abortos espontáneos recurrentes, retraso del crecimiento fetal, muerte fetal intrauterina.
<b>Dermatológicas:</b>	Livedo reticularis, necrosis cutánea.
<b>Hematológicas:</b>	Trombocitopenia, déficit de protrombina.

Extraído de “Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos”, Buitrago JM, 2000.

**Tabla 2-8.**

Procesos en los que se han detectado anticuerpos contra los fosfolípidos.

---

**Enfermedades autoinmunitarias**

- LES
- Artritis reumatoide
- Esclerosis sistémica progresiva
- Dermatomiositis/Polimiositis
- Enfermedad mixta del tejido conjuntivo

**Exposición a fármacos**

- Clorpromacina
- Procaïn amida
- Hidralazina
- Quinidina
- Antibióticos
- Fenitoína

**Infecciones**

- Bacterianas
- Víricas
- Por protozoos

**Enfermedades linfoproliferativas**

- Leucemia de células peludas
- Linfomas malignos
- Macroglobulinemia de Waldenström

**Otros procesos diversos**

---

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

# **INTRODUCCIÓN**



# 1. EL SISTEMA INMUNITARIO <sup>1-4</sup>

## 1.1. INTRODUCCIÓN

El organismo humano posee sistemas que le protegen frente a la agresión por sustancias extrañas y microorganismos. El sistema inmunitario parece haber evolucionado como consecuencia del reconocimiento intercelular de los primitivos organismos multicelulares, al ser la comunicación entre las células esencial para el desarrollo de los órganos especializados. Al generarse estos mecanismos de reconocimiento surgió también la capacidad para discernir lo propio de lo extraño, tarea que realiza el sistema inmunitario. A lo largo de la evolución, el sistema adquirió también la función de eliminar las células extrañas que invadieran el organismo.

Antes de continuar con el desarrollo del sistema inmune vamos a recordar someramente una serie de conceptos, algunos de los cuales serán más adelante tratados con detenimiento.

**Anticuerpo.** Proteína producida por los linfocitos B que reacciona con un antígeno específico, sinónimo de **inmunoglobulina**.

**Antígeno.** Molécula capaz de estimular al sistema inmunitario y producir una respuesta inmune.

**Quimiotaxis.** Fenómeno por el cual ciertas células vivas son capaces de atraer y reclutar a otras células en razón del aumento de concentración de ciertas sustancias químicas producidas por las primeras (factores quimiotácticos).

**Complemento.** Grupo de proteínas que colaboran en el ataque a los antígenos.

**Citoquinas.** Proteínas solubles secretadas por el sistema inmune que actúan como mensajeros en la regulación de la respuesta inmune.

**Interleuquina.** Tipo de citoquina que actúa sobre una determinada variedad de células.

**Histocompatibilidad.** Significa, literalmente, "el tejido compatible". Su misión fundamental es discernir lo propio de lo extraño. Viene determinada por las moléculas del **Complejo Mayor de Histocompatibilidad** (CMH). Un sinónimo es el **HLA** (antígenos leucocitarios humanos).

**Respuesta inmune.** Respuesta de los componentes del sistema inmune a un antígeno.

## 1.2. INMUNIDAD INNATA Y ESPECÍFICA

Los sistemas inmunitarios innatos, naturales o nativos son la primera línea de defensa y actúan de manera inespecífica frente a los microorganismos y sustancias ajenas al cuerpo, mientras que los sistemas inmunitarios adquiridos, adaptativos o específicos representan mecanismos mucho más evolucionados que realizan su función movilizand o células y moléculas dirigidas de forma concreta contra el invasor particular.

**La inmunidad innata** está formada por las barreras naturales físicas (piel, epitelios...) y las sustancias químicas que éstas segregan, por las proteínas sanguíneas (complemento y otros mediadores de la inflamación) y por las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) y otros leucocitos (*natural killer*). Además de su función protectora, sirve también para iniciar la respuesta inmune especializada.

**La inmunidad adquirida**, actúa tras el reconocimiento de los antígenos extraños por linfocitos específicos, que proliferan y se diferencian en células efectoras cuya función es eliminar al antígeno.

La respuesta inmunitaria adaptativa o específica puede clasificarse en dos tipos: humoral y celular. En la respuesta inmunitaria humoral se producen anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos que los han inducido, mientras que en la respuesta inmunitaria celular se produce la activación de células especializadas, los linfocitos T, que reaccionan con los antígenos sobre la superficie de otras células que los han recogido y los presentan.

## 1.3. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA INMUNITARIO ADQUIRIDO

### 1.3.1. ESPECIFICIDAD

Cada elemento extraño es reconocido por elementos diferentes del sistema inmunitario, de forma que las respuestas inmunitarias son específicas de los antígenos y, a su vez, de regiones específicas de estos. Los receptores para el antígeno sobre la superficie de cualquier célula individual B o T son específicos para un único grupo o disposición molecular dentro de la estructura del antígeno (determinante antigénico o epítipo).

### **1.3.2. DIVERSIDAD**

El cuerpo humano es capaz de generar respuestas contra un número muy elevado de determinantes antigénicos. Aunque cada célula B o T tiene receptores de superficie con una única especificidad, colectivamente tienen un número muy grande de especificidades. Esta diversidad se genera, durante el desarrollo de la célula B o T, por el reagrupamiento al azar de la información genética que codifica los polipéptidos que componen las moléculas del receptor y es independiente de la presencia del antígeno. El conjunto de receptores de los linfocitos se denomina repertorio inmunológico.

### **1.3.3. TOLERANCIA**

Capacidad para reconocer, responder y eliminar los antígenos extraños, al mismo tiempo que no se reacciona frente a las sustancias antigénicas propias.

La tolerancia se consigue por la eliminación de los linfocitos que expresan receptores específicos para los antígenos propios y por la inactivación de los linfocitos activados tras el contacto con dichos antígenos.

### **1.3.4. MEMORIA**

La exposición del sistema inmunitario a un antígeno potencia su capacidad de respuesta frente al mismo, de forma que en una segunda exposición la respuesta es más rápida, duradera y, con frecuencia, cuantitativamente diferente. Esta memoria inmunológica se debe al aumento del clon de linfocitos específicos y al desarrollo de células memoria.

## **1.4. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNITARIO.**

### **1.4.1. TEJIDO LINFOIDE**

Lugar en el que se desarrollan las células inmunitarias y donde se generan las respuestas inmunes.

Está constituido por los órganos linfoides primarios, médula ósea y timo, donde se desarrollan las células inmunocompetentes, y por los órganos linfoides secundarios, ganglios linfáticos, bazo y diversas zonas de la mucosa digestiva y respiratoria, donde se generan las respuestas inmunitarias.

En la médula ósea se producen todas las células sanguíneas y maduran los linfocitos B. El timo es el lugar en el que maduran los linfocitos T.

En los ganglios linfáticos, y en cierta medida también el bazo, se produce el reconocimiento inmunitario de las sustancias extrañas. Todas estas estructuras linfoides están conectadas por medio de un sistema linfático que conduce a los linfocitos a través de los tejidos desde la sangre a los ganglios linfáticos y de regreso a la circulación sanguínea.

#### **1.4.2. CÉLULAS INMUNITARIAS**

Las principales células de la respuesta inmunitaria son los linfocitos (Figura 1-1). Otras que participan son los monocitos, macrófagos y granulocitos. Los linfocitos son específicos de los antígenos a los que reconocen por medio de receptores situados en la superficie celular. Hay dos tipos principales: los B y los T. Los monocitos y los macrófagos forman parte del sistema mononuclear fagocítico y tienen como función principal la fagocitosis, esto es, la ingestión de las sustancias y microorganismos extraños. Los granulocitos participan en la fase efectora de la respuesta inmunitaria adaptativa.



**Figura 1-1.** Imagen representativa de un linfocito.

#### **1.4.3. LINFOCITOS B**

Los linfocitos B maduran en la médula ósea y son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Sus receptores son inmunoglobulinas de superficie (sIg). La activación de los linfocitos B por los antígenos en los órganos linfoides secundarios conduce a la secreción de anticuerpos por la progenie de células



plasmáticas derivadas de estas células B, estos son idénticos o muy semejantes a dichos receptores de superficie celular. Los anticuerpos reconocen principalmente determinantes conformacionales de moléculas complejas y, en principio, no requieren la presentación antigénica por células especializadas.

#### **1.4.4. LINFOCITOS T**

Los linfocitos T maduran en el timo y tienen como funciones principales el regular todas las respuestas inmunitarias frente a antígenos proteicos y colaborar en la eliminación de los microorganismos intracelulares. Actúan por medio del receptor de células T (TCR) que se encuentra en la superficie celular. Los TCR reconocen pequeños péptidos situados en las hendiduras de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie de células presentadoras.

Existen varias subclases de acuerdo con su función o estado de diferenciación. Los antígenos marcadores de los distintos grupos se nombran mediante la nomenclatura CD (clase de diferenciación). Todos los linfocitos T periféricos poseen marcadores CD2, CD3 y CD5. Las dos subclases principales son las células T colaboradoras (Th) y las citolíticas o citotóxicas (Tc). Los Th (TCD4) ayudan a las células B a producir anticuerpos, a otras células a mediar en las respuestas inmunitarias y activan a los macrófagos. Los Tc (TCD8) destruyen específicamente las células extrañas o las células infectadas por virus.

Hay dos subpoblaciones de Th, Th1 y Th2, que se desarrollan a partir del mismo precursor, un linfocito CD4 virgen. La diferenciación está determinada por la estimulación, especialmente por el tipo de citoquina producida en el momento de reconocimiento del antígeno, después, una vez desarrollada una subpoblación, produce citoquinas que inhiben la diferenciación hacia la otra.

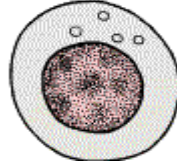
Las Th1 producen:  $INF_{\gamma}$ , IL-2,  $TNF_{\alpha}$  y  $TNF_{\beta}$ , citoquinas proinflamatorias, mediadores importantes de las reacciones de hipersensibilidad retardada, eficaces contra virus y microorganismos intracelulares.

Las Th2 producen: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, citoquinas que estimulan las respuestas de anticuerpos de los linfocitos B y las defensas contra los parásitos, como la producción de IgE.

#### **1.4.5. CÉLULAS NK**

Las NK (*natural killer*, asesinas naturales) son otro tipo de linfocitos granulares grandes (Figura 1-2),

que carecen de un tipo específico de receptores para el antígeno pero que son capaces de reconocer y destruir células anormales. Destruyen principalmente las células infectadas por virus y determinadas células tumorales.

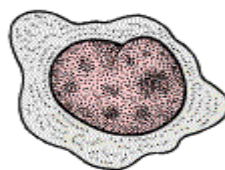


**Figura 1-2.** Imagen representativa de una *natural killer*.

#### **1.4.6. FAGOCITOS MONONUCLEARES**

Las células del sistema mononuclear fagocítico constituyen la segunda población celular en importancia del sistema inmunitario. Se forman y, normalmente, maduran en la médula ósea. Los monocitos entran en la sangre periférica donde permanecen de uno a tres días antes de penetrar en los tejidos, madurando y convirtiéndose en macrófagos (Figura 1-3). Los macrófagos se encuentran en todos los órganos y tejidos conjuntivos y reciben nombres característicos en cada uno de ellos (en los capilares sinusoidales hepáticos se llaman células de Kuppfer, en el sistema nervioso central microglía, en los pulmones macrófagos alveolares y en el hueso osteoclastos); también se encuentran libres en los exudados peritoneales y en la circulación sanguínea.

Los macrófagos participan en aspectos iniciales no específicos de la respuesta inmunitaria, ingiriendo sustancias extrañas o productos autólogos de deshecho. Sin embargo, su principal función es colaborar con los linfocitos T en la respuesta inmunitaria celular. Exhiben en su superficie los antígenos extraños que son reconocidos por los linfocitos T específicos. Actúan así como células presentadoras de antígenos (APC).



**Figura 1-3.** Imagen representativa de un macrófago.

### 1.4.7. GRANULOCITOS

En la sangre periférica se encuentran tres tipos que se han agrupado de acuerdo con sus características de tinción con colorantes (neutrófilos o polimorfonucleares, eosinófilos y basófilos). Los neutrófilos (Figura 1-4) son células fagocíticas que engullen a los patógenos recubiertos de anticuerpos y los destruyen en vesículas intracelulares. Los eosinófilos atacan a grandes parásitos como los helmintos recubiertos de anticuerpos y los basófilos participan en las reacciones de hipersensibilidad inmediata.



**Figura 1-4.** Imagen representativa de un neutrófilo.

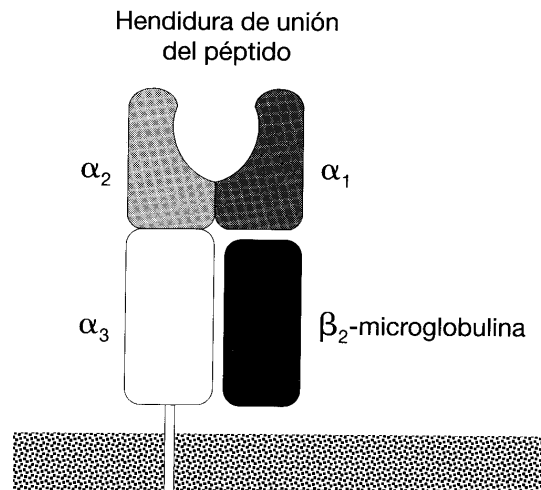
### 1.4.8. MASTOCITOS

Son grandes células que se encuentran en el tejido conjuntivo que se distinguen por sus grandes gránulos secretores que contienen muchos mediadores inflamatorios. Se unen de forma estable a los anticuerpos IgE monoméricos a través del receptor Fc I de muy elevada afinidad. El entrecruzamiento del antígeno con el anticuerpo IgE unido al mastocito desencadena la secreción de mediadores inflamatorios que dan lugar a inflamación local que recluta células y proteínas requeridas para la defensa de los lugares de la inflamación.

## 1.5. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

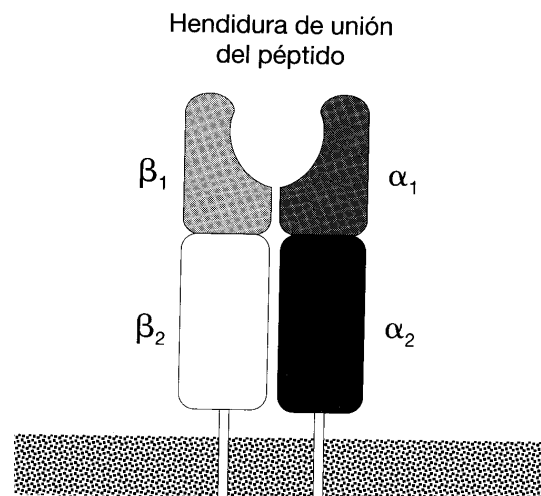
Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6. Hay dos clases de genes CMH denominados de clase I y de clase de II. Las moléculas CMH de clase I y clase II son glucoproteínas de superficie que poseen diferentes estructuras de subunidades.

Las moléculas CMH clase I constan de dos cadenas polipeptídicas, una  $\alpha$  o cadena pesada codificada por el CMH y una cadena menor asociada de forma no covalente, la  $\beta_2$ -microglobulina, no codificada por el CMH. La cadena  $\alpha$  tiene tres dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , el plegado de los dos primeros crea una gran hendidura que es el lugar en el que se unen a estas moléculas los antígenos peptídicos (Figura 1-5).



**Figura 1-5.** Esquema de la estructura de una molécula CMH de clase I.

Las moléculas CMH de clase II constan de un complejo de dos cadenas unidas no covalentemente, la  $\alpha$  y la  $\beta$ . Cada cadena posee dos dominios. Los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  forman la hendidura donde se unen los antígenos peptídicos (Figura 1-6).



**Figura 1-6.** Esquema de la estructura de una molécula CMH de clase II.

Las moléculas CMH de clase I y de clase II se expresan en las células de forma diferente. Las de clase I, que presentan los péptidos de los patógenos citosólicos (principalmente los virus a los linfocitos T citotóxicos), se expresan prácticamente en todas las células nucleadas. Las de clase II, que presentan péptidos de proteínas degradadas en vesículas endocíticas, procedentes de patógenos que han sido engullidos por los macrófagos o de péptidos de antígenos específicos internalizados por los receptores de inmunoglobulinas de las células B, se expresan sólo en estos tipos celulares.

El CMH posee dos propiedades fundamentales: poligenia y polimorfia. Poligénico significa que hay varios genes CMH de clase I y de clase II que codifican proteínas con diferentes especificidades de unión del péptido. Por otro lado, el CMH es muy polimórfico ya que existen múltiples alelos de cada gen. La combinación determinada de alelos CMH de una persona es su haplotipo CMH.

Existen tres clases de genes de la cadena de la clase I que se denominan HLA-A, -B y -C. Existen también tres pares de genes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de clase II, denominados HLA-DR, -DQ y -DP. La mayoría de los alelos difieren entre ellos por múltiples sustituciones de aminoácidos que se centran fundamentalmente en el sitio de unión del péptido y las regiones adyacentes donde se establece el contacto directo con el receptor de la célula T.

Las moléculas CMH de clase I y de clase II, aunque presentan diferencias sutiles, comparten muchas de sus principales características estructurales. La más importante son los dos dominios extracelulares anteriores que forman la gran hendidura en la que se atrapa un único fragmento peptídico durante la síntesis y ensamblaje de la molécula CMH dentro de la célula. La molécula CMH con un péptido cargado se transporta a la superficie celular donde éste se presenta a los linfocitos T. Los receptores de antígenos de dichos linfocitos están especializados en el reconocimiento de un fragmento peptídico foráneo unido a la molécula CMH.

Una vez que alcanzan la superficie celular con su carga de péptidos antigénicos, las dos clases de moléculas CMH son reconocidas por clases funcionales diferentes de células T. Las moléculas CMH de clase I que llevan péptidos víricos son reconocidas por las células Tc que destruyen la célula infectada, mientras que las moléculas CMH de clase II que llevan péptidos que derivan de patógenos que viven en las vesículas de los macrófagos o que son captados por las células B son reconocidos por las células Th1 o Th2.

Una vez que han sido reconocidas sus dianas, los tres tipos de células T son estimulados y segregan diferentes moléculas efectoras que pueden afectar directamente sus células diana o colaborar en el reclutamiento de otras células efectoras. Entre estas moléculas efectoras se encuentran muchas citoquinas que desempeñan un papel crucial en la expansión clonal de los linfocitos, así como en las respuestas inmunitarias innatas y en las acciones efectoras de la mayoría de las células inmunitarias.

## 1.6. ANTICUERPOS

Los anticuerpos son las proteínas que se unen específicamente a los antígenos (Ag). Son producidos por los linfocitos B y su progenie las células plasmáticas.

Los anticuerpos reciben el nombre de inmunoglobulinas (Ig). Las Ig son glucoproteínas compuestas por un 82-96% de proteína y un 4-18% de hidrato de carbono. En el hombre existen cinco clases diferentes o isotipos de Ig que se denominan IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las IgG pueden subdividirse en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, mientras que las IgA presentan dos, IgA1 e IgA2. Todas las moléculas de Ig poseen cuatro cadenas polipeptídicas, dos idénticas grandes o pesadas (H) y otras dos idénticas pequeñas o ligeras (L), que se encuentran enlazadas por fuerzas no covalentes y enlaces covalentes disulfuro intercadenas (Figura 1-7). Las IgM e IgA pueden formar multímeros; las moléculas de IgM se encuentran en el plasma como pentámeros y ocasionalmente hexámeros, mientras que las de IgA en las secreciones mucosas, aunque no en el plasma, se encuentran principalmente como dímeros.

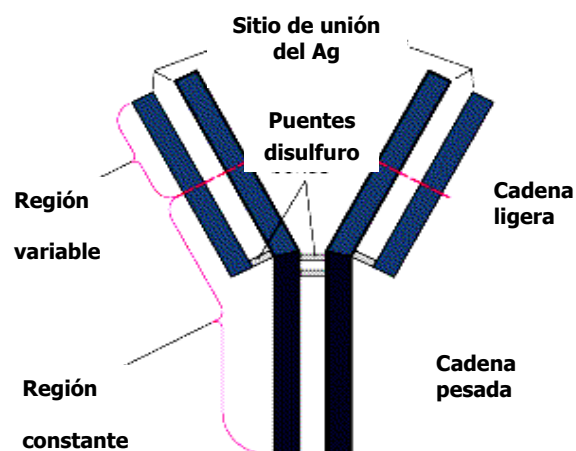


Figura 1-7. Estructura de una molécula de Ig.

Las IgG son el isotipo más abundante del suero, son las principales Ig que se forman en la respuesta secundaria. Atraviesan la placenta y son las responsables de la protección del recién nacido, siendo las que mejor difunden a los espacios extravasculares del organismo, donde predominan y se encargan de la defensa frente a los microorganismos y toxinas bacterianas. Las IgA son los principales anticuerpos de la mayoría de las secreciones externas, son las Ig más abundantes secretadas por las células plasmáticas en las glándulas y membranas mucosas; así, son abundantes en las lágrimas, la saliva, el sudor, las secreciones gastrointestinales y las secreciones pulmonares. Las IgM son la Ig que predominan en la respuesta inmunitaria inicial frente a un antígeno y en determinadas respuestas de la inmunidad humoral. Las IgD parecen participar en la diferenciación de los linfocitos. Finalmente, las IgE son las mediadoras de las reacciones alérgicas o de hipersensibilidad inmediata.

## **1.7. CITOQUINAS**

Las citoquinas son pequeñas glucoproteínas con pesos moleculares comprendidos entre 8000 y 30000 dalton que median la comunicación entre las células de los sistemas inmunitario y hematopoyético. Ejercen su función biológica por medio de receptores específicos localizados en la superficie de sus células diana. Son producidas por una gran variedad de células diferentes y actúan sobre prácticamente la totalidad de los tejidos o sistemas orgánicos. Las citoquinas actúan normalmente de forma autocrina (sobre la misma célula que las produce), paracrina (sobre células cercanas) o endocrina (sobre células a distancia).

Una característica de las citoquinas es su pleiotropía y redundancia funcional. La mayoría poseen varios efectos biológicos sobre tejidos y células. Además, funcionan de forma redundante ya que diferentes citoquinas pueden actuar sobre el mismo tipo celular o mediar efectos semejantes.

Las citoquinas pueden clasificarse de acuerdo con:

1. Su origen celular. Linfoquinas y monoquinas.
2. Su función. Según median y regulen la inmunidad innata, la inmunidad específica o estimulen la hematopoyesis.
3. Su grupo familiar. Interleuquinas, interferones, factores de necrosis tumoral y factores de crecimiento transformantes.

4. Su estructura fisicoquímica. Citoquinas con cuatro haces de hélices  $\alpha$ , citoquinas con estructura  $\alpha/\beta$  de cadena corta, citoquinas con estructura de lámina  $\beta$  de cadena larga y citoquinas con estructura de mosaico.

## 1.8. RESPUESTA INMUNITARIA

La respuesta inmunitaria puede definirse de forma simple como el conjunto de mecanismos que se ponen en marcha tras el contacto del sistema inmunológico con una sustancia extraña. Esta respuesta puede dividirse en tres fases. En la primera fase, que opera inmediatamente, los elementos del sistema inmunitario innato, que son inespecíficos, actúan directamente contra el invasor. En pocas horas se desencadena la segunda fase en la que actúan mecanismos de defensa inducidos, aunque aún no específicos. Finalmente, la tercera fase es la respuesta inmunitaria específica o adaptativa basada en la selección de células específicas. Las dos formas de respuesta final son la generación de anticuerpos y la activación de linfocitos T que, directamente (linfocitos Tc) o a través de la activación macrofágica (linfocitos Th), destruyen los antígenos.

El desarrollo de un sistema inmunitario anticipador requiere la capacidad de reconocer un gran espectro de patógenos potenciales con ninguno de los cuales se ha encontrado durante su desarrollo. El componente celular (célula T) y humoral (célula B) de la respuesta inmunitaria ha desarrollado mecanismos diferentes, aunque solapables, para llevar a cabo esta función.

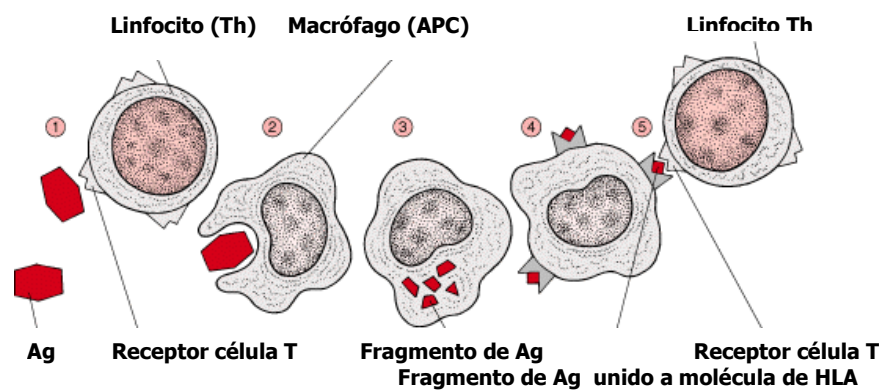
La generación de anticuerpos por las células plasmáticas en respuesta a los antígenos se produce de dos formas diferentes, de acuerdo con el requerimiento de factores (citoquinas) derivados de los linfocitos T. Algunas sustancias pueden activar policlonalmente a los linfocitos B. Sin embargo, la mayor parte de los antígenos requieren un estímulo doble para la síntesis de anticuerpos: Presencia del antígeno y citoquinas derivadas de los linfocitos Th. A su vez, los linfocitos Th necesitan la presentación del antígeno unidos a moléculas de HLA de clase II, así como citoquinas macrofágicas para producir sus propias citoquinas.

Los linfocitos T sólo reconocen antígenos que han sido previamente degradados y luego presentados a ellos por una molécula HLA. Por tanto, la interacción del antígeno y su receptor en los linfocitos T sólo se produce entre dos células; es una interacción trimolecular. Las células TCD4 activadas segregan citoquinas



que ayudan a la generación de células efectoras T y B, y así a respuestas inmunitarias. Algunas TCD4 (Th2) parecen estar restringidas a formar citoquinas que principalmente promueven la formación de ciertas clases de Ig, mientras que otras células T, provisionalmente denominadas células colaboradoras tipo I o células TCD4 inflamatorias, expresan citoquinas que colectivamente median la activación de mecanismos de hipersensibilidad retardada (activación macrofágica, etc.).

De forma simplificada la respuesta inmunitaria puede describirse tal como sigue. El antígeno es ingerido de forma no específica por células del sistema mononuclear fagocítico o células dentríticas, que se denominan genéricamente células presentadoras de antígeno (APC), en su interior el antígeno se degrada parcialmente y los fragmentos de ocho o nueve aminoácidos pasan a la superficie de la célula donde se unen en una hendidura de una molécula HLA de clase II. De esta forma se presenta el antígeno que es "detectado" por los linfocitos Th que se unen a él (Figura 1-8).



**Figura 1-8.** Primera fase de la respuesta inmunitaria.

La unión del receptor de la célula al antígeno produce la secreción local de citoquinas por las APC, lo que estimula la proliferación y diferenciación de la célula T. Como respuesta a la unión del antígeno a las células macrofágicas, las células T segregan IL-2, que induce la proliferación de los linfocitos T específicos del antígeno, amplificando de esta manera la respuesta muy rápidamente.

Al mismo tiempo, los linfocitos B que expresan en su superficie el receptor Ig internalizan la molécula extraña. Aquí, se degrada parcialmente y se reexpresa asociada con moléculas HLA de clase II sobre la superficie de los linfocitos B. Los linfocitos Th que ya se han activado por las APC reconocen el

fragmento del antígeno asociado con las moléculas de clase II sobre la superficie del linfocito B y se unen a él mediante el receptor del linfocito T.

La unión de linfocitos Th activados a los linfocitos B proporciona el estímulo esencial para la proliferación y diferenciación de estos últimos. Los linfocitos Th secretan IL-4 y 5 que inducen la diferenciación de los linfocitos B activados, bien hacia células plasmáticas (células B de vida corta que secretan grandes cantidades de anticuerpo específico normalmente suficientes para acabar con el antígeno) o bien, unas pocas, hacia células de memoria.

Los linfocitos Tc, por medio de sus receptores, reconocen fragmentos de anticuerpos unidos a moléculas HLA de clase I sobre la superficie de células infectadas; en este caso, pues, la célula presentadora del antígeno será la célula infectada o la célula tumoral. Tras su activación completa los linfocitos Tc son capaces de lisar las células que expresen el determinante antigénico.

## 2. AUTOANTICUERPOS. IMPORTANCIA CLÍNICA Y MÉTODOS DE DETECCIÓN

### 2.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los autoanticuerpos ha modelado el conocimiento actual sobre los mecanismos básicos de la regulación de la respuesta inmunitaria, mientras que su detección ha influido profundamente en los conocimientos de inmunología clínica e inmunopatología. La determinación de autoanticuerpos se ha convertido en una de las responsabilidades más importantes de los laboratorios clínicos. De hecho, la demostración de autoanticuerpos ha ido asumiendo, con los años, un papel cada vez más relevante en el diagnóstico y la monitorización de las enfermedades humanas.

Centrándonos en las enfermedades autoinmunes sistémicas, en la mayoría de ellas se detecta una respuesta inmunitaria humoral con la presencia de autoanticuerpos que reconocen diferentes autoantígenos intracelulares, muchos de ellos nucleares (ANA). Dado que se encuentran perfiles característicos de autoanticuerpos en cada una de estas enfermedades, su determinación ayuda a establecer el diagnóstico correcto, el pronóstico y, en muchos casos, facilita el seguimiento clínico y terapéutico. La presencia de anticuerpos anti-Sm y anti-dsDNA constituyen criterios de LES (lupus eritematoso sistémico)<sup>5</sup>, al mismo tiempo que la elevación de anticuerpos anti-dsDNA, y más cuando se asocia a una disminución de los valores del complemento, señala la posible aparición de un brote lúpico<sup>6</sup>, con lo que suele realizarse un refuerzo del tratamiento inmunosupresor. En el síndrome de Sjögren, los anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SS-B constituyen criterios diagnósticos<sup>7</sup>. En la esclerodermia, los anti-Scl-70, anti-U3-RNP y anti-RNA polimerasa I, II o III se corresponden con una afectación cutánea difusa asociada a una afectación sistémica más grave, lo cual indica la necesidad de un tratamiento más agresivo. Finalmente, los anticuerpos anti-Jo-1 caracterizan un subgrupo de pacientes afectados de polimiositis con síndrome antisintetasa, afectación pulmonar intersticial y mal pronóstico<sup>8</sup>.

## 2.2. AUTOINMUNIDAD FRENTE A ENFERMEDAD AUTOINMUNE

El sistema inmunitario es muy específico en el reconocimiento de los antígenos y una característica fundamental es su capacidad para discernir entre los antígenos propios y los extraños. La tolerancia del sistema inmunitario a los elementos propios es compatible con la capacidad de generar una respuesta frente a prácticamente cualquier elemento no propio<sup>9</sup>. Cuando la tolerancia inmunológica falla, el sistema inmunitario reacciona contra el propio organismo y se desarrolla autoinmunidad.

Las respuestas autoinmunitarias son, pues, la consecuencia natural de la amplitud del repertorio antigénico de los linfocitos T y B<sup>10</sup>. Para clasificar una enfermedad como autoinmune es necesario demostrar la presencia de una respuesta inmunitaria adaptativa frente a un antígeno propio que causa la enfermedad observada. Inicialmente, la demostración de la presencia de anticuerpos capaces de reconocer estructuras del tejido afectado en el suero de pacientes con diversas enfermedades se consideró como una evidencia de que estas enfermedades tenían una base autoinmune. Sin embargo, dichos anticuerpos también se encuentran cuando la lesión tisular está causada por traumatismos e infecciones. Ello sugiere que una lesión tisular primaria estimula la generación de autoanticuerpos, aunque en estos casos no suele producir enfermedad. Por lo tanto, es necesario demostrar que la lesión tisular está causada por una respuesta inmunitaria frente a autoantígenos para catalogar de autoinmune cualquier enfermedad<sup>11</sup>. La enfermedad autoinmune se define como la secuela patológica de una respuesta autoinmunitaria. La autoinmunidad viene reflejada por la presencia de anticuerpos (linfocitos B) o linfocitos T autorreactivos. En la práctica la demostración de linfocitos T autorreactivos todavía excede la capacidad de la mayoría de laboratorios clínicos. Por lo tanto y, debido a la relativa facilidad en determinar autoanticuerpos, su búsqueda seguirá siendo esencial para el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes en humanos durante el futuro inmediato, aunque el análisis de la autorreactividad de los linfocitos T será sin duda capital a más largo plazo.

Sin embargo, desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio, la realidad es que los autoanticuerpos son relativamente comunes en individuos humanos sin enfermedad autoinmune. Si se utilizaran métodos lo bastante sensibles, es muy probable que se encontraran autoanticuerpos de forma universal en la mayoría de los individuos. En otras palabras, estos autoanticuerpos que podríamos llamar

entonces anticuerpos naturales por su alta prevalencia, puede que sean fisiológicos, y podrían intervenir en un mecanismo normal de purga del organismo de elementos de desecho celular.

Existen, pues, dos limitaciones importantes en el uso de los autoanticuerpos en la práctica clínica:

1. La primera limitación proviene del hecho que los autoanticuerpos se observan, con frecuencia, en ausencia de enfermedad aparente. Estos "autoanticuerpos naturales"<sup>12</sup> se encuentran por lo general a títulos bajos, tienen una afinidad relativamente baja para el antígeno correspondiente y pertenecen mayoritariamente a la clase IgM. Pero éste no es siempre el caso, y algunas veces se encuentran IgG con afinidades y títulos relativamente elevados en ausencia de enfermedad. La presencia aislada de autoanticuerpo sin signos clínicos no es la base de un diagnóstico. Únicamente indica la posible conveniencia de establecer un seguimiento clínico preventivo del paciente.
2. La segunda limitación en el uso de los autoanticuerpos deriva de la primera: la detección de autoanticuerpos requiere definir de forma empírica el valor límite (o dintel) de la "normalidad". Únicamente se les puede conferir un significado clínico a los que se presenten con valores claramente superiores al dintel establecido empíricamente<sup>13</sup>.

Actualmente se acepta que la mayoría de los autoanticuerpos probablemente no constituyen la causa directa de la enfermedad, por lo que es recomendable considerarlos marcadores y no desencadenantes de la enfermedad.

### **2.3. ESTABLECIMIENTO DEL CARÁCTER AUTOINMUNITARIO DE UNA ENFERMEDAD**

La presencia de autoanticuerpos no implica necesariamente enfermedad autoinmune. El establecimiento del papel etiológico de la autoinmunidad requiere información que demuestre una relación con la enfermedad. Esta evidencia puede ser directa, indirecta o circunstancial.

### **2.3.1. EVIDENCIA DIRECTA**

La información directa requiere la demostración de que un anticuerpo autorreactivo es la causa inmediata de la lesión o la disfunción.

Diversas situaciones de este tipo están bien documentadas. Por ejemplo, las formas autoinmunes de anemia hemolítica, de leucopenia y de trombocitopenia están directamente producidas por autoanticuerpos. Los autoanticuerpos antirreceptores están claramente involucrados en la patogenia del hipertiroidismo de Graves y de la miastenia gravis<sup>14</sup>. Existen algunas evidencias que sugieren que anticuerpos antihormonas pueden producir las deficiencias correspondientes.

El papel causal de los autoanticuerpos en las enfermedades también puede investigarse a partir del estudio de las lesiones tisulares características de la enfermedad. Determinados autoanticuerpos pueden unirse directamente a la membrana basal del riñón en las glomerulonefritis o localizarse sobre los componentes intercelulares de la piel en el pénfigo y el penfigoide bulloso. Estos autoanticuerpos pueden ser eluidos y demostrar que causan la enfermedad mediante su transferencia a animales de experimentación. Los anticuerpos, además, pueden encontrarse en el órgano diana afectado en forma de inmunocomplejos, como en el lupus. En estas enfermedades son los inmunocomplejos, y no el anticuerpo individualmente, los que son patogénicos. Sin embargo, a veces resulta difícil demostrar el potencial patogénico de dichos inmunocomplejos.

En el caso de las enfermedades autoinmunes debidas a inmunidad celular, la evidencia directa de su etiología es más difícil de deducir. Se están diseñando modelos experimentales que permitan estudiar la implicación de las células T en la patogenia autoinmune; recientemente, se ha conseguido un modelo de tiroiditis autoinmune en ratones inmunodeficientes mediante la implantación de un fragmento de tejido tiroideo humano debajo de la cápsula renal, y la inyección posterior de linfocitos del paciente.

### **2.3.2. EVIDENCIA INDIRECTA**

En otros casos en los que no se ha podido demostrar que los autoanticuerpos o los linfocitos T son los causantes directos de las lesiones características, la etiología autoinmune se ha demostrado mediante métodos indirectos. Esta estrategia suele requerir, como premisa previa, la identificación del antígeno

diana de la respuesta autoinmunitaria y el aislamiento del antígeno equivalente de un animal de experimentación. Entonces se inmuniza a dicho animal con el antígeno candidato para determinar si se reproducen las lesiones propias de la enfermedad autoinmune. Esta estrategia ha resultado de valor incalculable para establecer, por ejemplo, el origen autoinmunitario de la enfermedad de Hashimoto, pero, obviamente, presenta algunas limitaciones importantes. La identificación del autoantígeno exige, en general un proceso largo y tedioso. Puede que el antígeno diana de los autoanticuerpos no se corresponda con el antígeno que inicia el proceso autoinmunitario, y tampoco resulta fácil encontrar un animal de experimentación apropiado. La susceptibilidad al desarrollo de enfermedad autoinmune varía entre especies y entre cepas. Puede ser necesario experimentarlo con muchas cepas de ratones, antes de identificar una susceptible. Finalmente, las lesiones que se producen en animales de experimentación raramente son comparables a las que se encuentran en seres humanos. Además de las diferencias esperadas entre especies, la enfermedad humana es a menudo compleja y, con frecuencia, interviene más de un antígeno. Sin embargo, una vez que se ha desarrollado un modelo animal adecuado, es posible llevar a cabo experimentos definitivos como la transferencia de linfocitos T autorreactivos para delinear los mecanismos patogénicos.

La inmunización experimental da mejores resultados en enfermedades autoinmunes organoespecíficas (como la miastenia gravis y la tiroiditis) que en las sistémicas. En el LES, se han desarrollado en ratones modelos de inducción genética mediante selección y cruce de los animales que desarrollaban espontáneamente la enfermedad<sup>15</sup>. En otros casos se han usado estrategias diferentes, como la consistente en alterar las funciones reguladoras de idiotipos, citocinas o factores tímicos.

### **2.3.3. EVIDENCIA CIRCUNSTANCIAL**

En realidad, la mayoría de las enfermedades humanas que se han definido como autoinmunes se consideran así sobre la base de evidencias circunstanciales. Como las enfermedades autoinmunes tienden a aparecer asociadas<sup>16</sup>, la presencia de otras enfermedades autoinmunes mejor definidas en el mismo individuo o en otros miembros de la familia refuerza la posible etiología autoinmune. La mayoría de enfermedades autoinmunes presentan asociaciones estadísticamente significativas con determinados haplotipos<sup>10, 15</sup>. En las lesiones de algunas enfermedades autoinmunes inducidas de forma experimental

predominan determinados productos de genes V en los TCR de los linfocitos T infiltrantes. La desviación en el uso de genes V particulares sugiere una etiología autoinmune<sup>17</sup>.

## **2.4. ANTICUERPOS CONTRA EL NÚCLEO**

### **2.4.1. TERMINOLOGÍA**

En la práctica ANA significa la presencia en el suero del paciente de estos anticuerpos antinucleares demostrables por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre cortes de tejido o líneas celulares, o por técnicas de enzimoimmunoanálisis (ELISA). Representan, pues, un conjunto heterogéneo de autoanticuerpos que reaccionan contra antígenos del núcleo celular, aunque algunos de ellos también se encuentren en el citoplasma.

Los ANA se clasifican según los patrones observados por IFI. El patrón lo produce la unión del anticuerpo a partículas y estructuras intracelulares y predice, aunque de forma imperfecta, la estructura o la partícula y las proteínas a las que se unen los anticuerpos. Sin embargo, excepto en algunos casos (p. ej. anticentrómero, anti-PCNA y anti-Ro/SSA en células transfectadas), los patrones de inmunofluorescencia no aportan la identificación definitiva de la especificidad de los anticuerpos presentes. Es muy habitual la mezcla de especificidades que se corresponden a la mezcla de patrones. Algunos patrones son producidos por más de una especificidad, y otros sólo tienen diferencias muy sutiles; por ejemplo, el moteado, que se corresponde con los anticuerpos frente a proteínas extraíbles del núcleo (ENA), grueso o fino (lo cual podría equivaler a anti-Sm y anti-SSA). Las pruebas secundarias son, por lo tanto, necesarias para la identificación del autoantígeno específico reconocido por unos autoanticuerpos determinados. El papel de la inmunofluorescencia para la prueba de ANA es seleccionar los sueros en los cuales estas pruebas secundarias son necesarias y guiar la selección de las mismas<sup>18</sup>.

Actualmente existe en el mercado un gran número de equipos de ELISA para la determinación de antinucleares, preparados con extractos celulares y mezclas de antígenos purificados y recombinantes, como alternativa a la inmunofluorescencia, que pueden originar falsos positivos y sin el valor añadido del patrón.



En conclusión, la prueba de IFI para determinar ANA presenta una buena capacidad para detectar uno o varios de estos anticuerpos, no tiene la especificidad diagnóstica de la detección de anticuerpos individuales, pero ha persistido y está considerada una prueba de detección sensible para la presencia de los ANA, siendo su papel en la actualidad el de confirmar la positividad obtenida en los sueros por ELISA (quedando éste como prueba de cribaje)<sup>19</sup> y, según los patrones resultantes, determinar las pruebas secundarias para llegar al diagnóstico. Cabe recordar que los ANA constituyen uno de los 11 criterios de la American Rheumatic Association para la clasificación del LES.

#### **2.4.2. NOMENCLATURA ESTÁNDAR DE LOS AUTOANTÍGENOS**

Los antígenos diana de los autoanticuerpos en algunas enfermedades son específicos de cómo la peroxidasa tiroidea y la tiroglobulina. En contraposición la mayoría de los antígenos nucleares, citoplasmáticos y otros, dianas de los autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunes sistémicas son comunes a todas las células nucleadas. La mayoría de los autoantígenos nucleares tienen como características comunes su conservación a través de la evolución y su participación en el ciclo celular, la transcripción y la traslación. Muchos de estos antígenos forman partículas funcionales (p. ej. nucleosomas y espliceosomas) con otras proteínas y se encuentran a menudo acoplados a ácidos nucleicos. Los antígenos nucleares individuales y los autoanticuerpos que los reconocen se denominan de formas diversas según su localización histológica (nucleolar, centrómero)<sup>20</sup>, su aspecto en la IFI (moteado, homogéneo), el nombre del paciente en el cual se descubrió por primera vez (Sm, Ro, La), la enfermedad asociada al autoanticuerpo (SSA, SS-B), la partícula en la que se encuentra (snRNP) o su naturaleza química (dsDNA)<sup>20</sup>.

En las secciones de tejidos y en las líneas celulares usadas en las pruebas de inmunofluorescencia para determinar ANA, los autoantígenos se encuentran en su forma nativa y sólo mínimamente desnaturalizados. Su estructura terciaria, los epítomos, la glucosilación y su asociación a otras proteínas, ácidos nucleicos, partículas y membranas están conservadas. Los antígenos (excepto Ro/SSA) están conservados, no son específicos de tejido y, por tanto, su presencia es predecible en todos los tejidos de vertebrados o, por lo menos, de mamíferos. En estudios sistemáticos, el hígado, el riñón y algunas líneas

celulares de seres humanos, monos, perros, diversos roedores (ratón, rata, conejo y hámster) y pollos, eran groseramente equivalentes como substratos para detectar ANA frente a antígenos. Por el contrario, Ro/SSA se encuentra en calidad y cantidad suficientes en células humanas, de monos, perros y cobayas, pero no en ratón, rata, conejo o hámster. Es más, en las líneas celulares cancerosas humanas y en las de mono epiteliales y renales se encuentran en mayor abundancia que en las linfoides<sup>20</sup>.

### **2.4.3. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS EN LOS MEDIOS DE DETECCIÓN**

#### **2.4.3.1. FIJACIÓN Y PERMEABILIZACIÓN**

Metodológicamente la integridad de las estructuras antigénicas de las secciones de los tejidos está preservada porque no han sufrido ningún tratamiento. Sin embargo, una fijación leve con acetona puede mejorar la conservación del tejido y reducir la posible elución de antígenos solubles durante el proceso<sup>18</sup>.

Las células mantenidas en cultivo, y cultivadas en monocapa sobre el portaobjetos, tienen intacta la membrana, por lo cual se precisa una permeabilización de la membrana celular con un solvente lipídico para asegurar que los anticuerpos alcancen los antígenos intracelulares. Es habitual el uso de la fijación adicional, variando la fijación óptima según los antígenos.

#### **2.4.3.2. SECCIONES DE TEJIDO**

Una ligera fijación con acetona mediante inmersión de las secciones recién cortadas puede mejorar la conservación, y reducir la elución del antígeno soluble del tejido durante el proceso<sup>18</sup>. La sensibilidad en la detección de los anticuerpos frente a antígenos conservados es similar a la que se obtiene en células cultivadas.

Existen controles de sensibilidad para los cuales se encuentran establecidas las unidades internacionales correctas<sup>20</sup>.

La desventaja es que los tejidos sólidos son pobres en Ro/SSA, los núcleos y los nucleolos son pequeños, y se encuentran pocas células en división. Puede subestimarse la presencia de algunos anticuerpos cuyos patrones de la fase del ciclo celular.

### 2.4.3.3. CÉLULAS CULTIVADAS Y LÍNEAS CELULARES

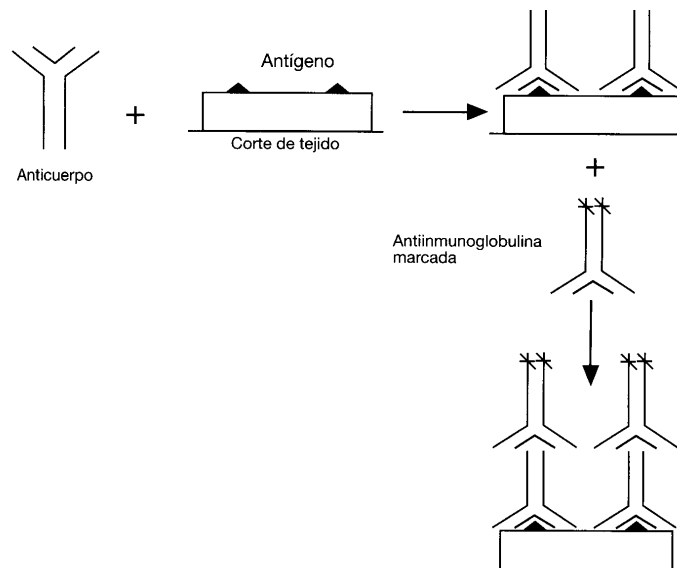
Las células cultivadas en monocapa sobre portaobjetos, en particular Hep-2 (una línea celular de carcinoma humano laríngeo, American Type Culture Collection, ATCC, CCL-23), están sustituyendo al tejido de roedor. Los núcleos y los nucleolos son grandes, y las células en división abundantes, con lo que los patrones son fácilmente reconocibles. Hay que tener en cuenta a la hora de trabajar con este material que se requiere permeabilización y fijación de las células.

### 2.4.3.4. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La IFI es una de las técnicas más usadas en los laboratorios clínicos para descartar la presencia de anticuerpos específicos que reconocen antígenos celulares. Su elevada sensibilidad permite la detección de anticuerpos humanos en concentraciones inferiores a 0,1 µg/ml. Esta técnica, cuando los resultados se expresan en forma de título, es semicuantitativa, y es fácilmente adaptable para la detección y la medida de algunos anticuerpos específicos clínicamente importantes<sup>21, 22</sup>.

Las pruebas de IFI (Figura 2-1) se realizan mediante la incubación de suero del paciente diluido sobre finas secciones de tejidos humanos o animales o células cultivadas, que han sido químicamente fijadas para permitir la entrada de anticuerpos específicos<sup>18</sup>. Como método de detección se suelen usar cortes de triple tejido de rata (hígado + estómago + riñón), aunque cabe recordar que las células humanas Hep-2 ya están reemplazando a dicho tejido de roedor. Después de la incubación, los anticuerpos no unidos y las proteínas del suero se eliminan mediante un lavado. A continuación, se pipetea sobre el substrato celular un anticuerpo (reactivo secundario, *second stage antibody*), por ejemplo antiinmunoglobulina humana conjugada con fluorocromo (habitualmente fluoresceína isocianato, FITC). Este nuevo reactivo se une a cualquiera de los anticuerpos específicos que se encuentren capturados por antígenos del substrato. Según la aplicación específica de la prueba, se elige un reactivo antiinmunoglobulina humana que reconozca específicamente cualquiera o todos los isotipos prevalentes de las inmunoglobulinas humanas, que son IgG, IgM e IgA. Aunque hay que tener en cuenta que en los ANA, el isotipo IgG (IgG1 e IgG3) es el que predomina sobre los isotipos IgA e IgM y se considera suficiente para detectar los sueros que tienen ANA, además, la detección de estos isotipos no predominantes no incrementa la sensibilidad de la prueba y reduce su especificidad.

El anticuerpo antiinmunoglobulina humana unido al tejido puede, entonces, visualizarse con un microscopio de fluorescencia; esta fluorescencia del tejido o de las células usadas como substrato indicará, pues, la presencia de anticuerpos específicos. La correcta realización de las pruebas de IFI para anticuerpos específicos requiere una atención especial al control de calidad de las muestras que se analicen, los tejidos y las células usadas de substrato, y del antisuero antiinmunoglobulina humana conjugado con fluorocromo<sup>18</sup>. Las muestras óptimas para analizar son sueros de pacientes en ayunas; los sueros lipémicos o hemolizados producen un incremento de la fluorescencia de base. Además, cada serie de pruebas para muestras de pacientes debe incluir suero control positivo y negativo conocidos.



**Figura 2-1.** Inmunofluorescencia indirecta.

El control de calidad a largo término requiere la comparación de lotes sucesivos de portaobjetos de substrato con sueros controles conocidos positivo y negativo para asegurar que la unión inespecífica de inmunoglobulinas humanas del suero negativo es mínima y que se mantienen títulos similares unión de anticuerpos específicos (+/- una dilución) del suero control positivo. También deben compararse los lotes sucesivos de antisueros antiinmunoglobulina humana para asegurar la reproducibilidad del sistema analítico. Estos reactivos vienen caracterizados según su contenido de anticuerpo con relación a la proteína total, la relación fluorocromo/proteína (típicamente adecuada a nivel de 2 o 3 moles de fluorocromo por 3 moles de proteína), y la dilución del reactivo de antisuero que aporta la mayor especificidad con relación a

la fluorescencia inespecífica tal como demostrarse mediante sueros control positivo y negativo bien caracterizados. En la mayoría de ensayos por IFI también es aconsejable determinar de manera periódica un suero control débilmente positivo para asegurar que no ha disminuido la sensibilidad analítica con el tiempo de almacenaje de los cortes o del antisuero conjugado con fluorocromo<sup>18, 20</sup>.

En la determinación de ANA los sueros se diluyen, como anteriormente se ha citado, con solución salina tamponada para incrementar la relación entre la señal y la tinción de fondo. Las diluciones más empleadas son 1:20 y 1:40. Las concentraciones se obtienen efectuando diluciones seriadas del suero del paciente. Los resultados se expresan como la última dilución positiva, el intervalo de concentración que incluya la concentración real, por ejemplo [160, 320 u. arb.]<sup>23</sup> o mediante una escala de intensidad de fluorescencia que se lee en la dilución inicial y se interpreta como de 0 a +4, desde indetectable a máxima intensidad de fluorescencia<sup>20</sup>. Con este último método no es necesario efectuar diluciones seriadas, la escala de fluorescencia puede establecerse en relación con un estándar OMS (ejemplo OMS 66/233) y existen soportes informáticos que permiten obtener una curva de calibración sobre la que leer la intensidad de la fluorescencia.

#### 2.4.3.5. PATRONES DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se puede conseguir una tipificación inicial tanto con tejido de roedores como con líneas celulares humanas usando una magnificación de 40 aumentos. La textura y la localización de la inmunofluorescencia y la variación con el ciclo celular, tal como se evidencia sobre líneas celulares, aportan información adicional. Puede diferenciarse un número mayor de patrones sobre células en cultivo debido al mayor tamaño de sus núcleos y a la presencia de células en diferentes fases de la mitosis que sobre las secciones de tejido. Se consigue una mejor discriminación de los patrones principales con una magnificación de 100 aumentos.

El método de fijación del substrato es importante ya que algunos antígenos nucleares, como Sm y La, son extremadamente solubles y pueden quedar eluidos o redistribuidos, causando resultados de ANA falsamente negativos<sup>18</sup>. Igualmente, debe tenerse en cuenta que algunos ANA se asocian a más de un patrón de inmunofluorescencia. Por ejemplo, los PM-Scl y los Scl-70 se caracterizan por un patrón que es simultáneamente nucleolar y nucleoplasmático. Por otro lado, los anticuerpos que reconocen las proteínas

asociadas a DNA o del nucleoplasma pueden enmascarar otros patrones simultáneos. Por lo tanto, es necesario interpretar con cautela los resultados de los ANA.

En la imagen de fluorescencia se pueden observar diferentes patrones: homogéneo, moteado, nucleolar, en anillo, huso mitótico y citoplasmático (aunque este último no sea estrictamente nuclear). Existen controles cualitativos para la estandarización de los patrones de los ANA<sup>24</sup>. En la Tabla 2-1 se relacionan los antígenos con las imágenes que producen sus autoanticuerpos en la IFI.

**Patrón homogéneo.** El núcleo aparece con una fluorescencia difusa y los cromosomas teñidos en las células en mitosis; en ocasiones, puede observarse un refuerzo periférico en las células en interfase.

**Patrón moteado.** Aparecen numerosos puntos de fluorescencia diseminados por el nucleoplasma. El moteado puede ser grueso, fino o cuantificable. Cuando los anticuerpos se dirigen contra las proteínas centroméricas se observa un patrón moteado que se ve claramente en mitosis. Los anticuerpos que originan un patrón cuantificable con 8-10 puntos reconocen como antígeno fundamental a la proteína Sp 100 y también, a una proteína de la leucemia promielocítica. Se detectan en el 25% de los pacientes con cirrosis biliar primaria e indican un curso favorable de la enfermedad<sup>25</sup>.

**Patrón nucleolar.** En este patrón se tiñen exclusivamente los nucleolos, pudiendo ser, a su vez, esta tinción homogénea o moteada. El patrón nucleolar se puede observar aislado o asociado con otros patrones.

**Patrón en anillo.** Los anticuerpos se dirigen contra antígenos de la envoltura nuclear y la fluorescencia se desintegra durante la mitosis. Se han descrito estos anticuerpos en pacientes con hepatitis autoinmunes, cirrosis biliar primaria, LES o esclerodermia.

**Patrón huso mitótico.** Los anticuerpos se observan exclusivamente en las células que se dividen, como son los anticuerpos dirigidos contra los componentes del huso mitótico. Estos anticuerpos se detectan con escasa frecuencia en el LES.

Los patrones de fluorescencia pueden sugerir, pues, la presencia de un antígeno determinado, por ello los informes de una prueba de ANA se componen del título o la semicuantificación equivalente y el patrón de fluorescencia. No obstante se observan considerables discrepancias entre los informes de los diferentes laboratorios que pueden deberse a múltiples factores, como la diversidad y el modo de fijación

**Tabla 2-1.**

Partículas y antígenos predominantes de los ANA y su relación con los patrones observados en IFI.

<b>Partícula</b>	<b>Antígenos</b>	<b>Patrón</b>
Cromatina	DNA, Histona, Topoisomerasa-1	Homogéneo, refuerzo periférico
Matriz nuclear	snRNP	Moteado grueso
UsnRNP	Componentes polipeptídicos RNP/Sm	Moteado grueso
scRNP	Componentes polipeptídicos Ro y La	Moteado fino
Centrómero	Proteínas centroméricas	Cuantificable, 46 puntos
Cuerpo nuclear	Sp 100	Cuantificable, 5-10 puntos
Cuerpo espiral	Coilina p80	Cuantificable, 2-6 puntos
PCNA	Ciclina	Pleomórfico
Membrana celular	Laminina A, B, C, gp210, p58	Anillo
Preribosomas	Nucleolina (Pm/ScI)	Nucleolar homogéneo
RNA polimerasa	Polimerasa I, II, III	Nucleolar moteado
U3snoRNP	Fibrilarina	Nucleolar moteado
T-2/MRP snoRNP	NOR-90	Nucleolar con puntos
Centriolo	Enolasa 48	Puntos vértice del huso mitótico
MSA	Tubulina	Fibras del huso mitótico
NuMA	NuMA 250	Polos del huso mitótico
MSA-2		Cuerpo medio
MSA-3		Gránulos alrededor de la placa de Metafase

UsnRNP, ribonucleoproteínas de pequeño tamaño ricas en uracilo; scRNP, ribonucleoproteínas de pequeño tamaño citoplasmáticas; snoRNP, ribonucleoproteínas de pequeño tamaño nucleolares. Extraído de “Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos”, Buitrago JM, 2000.

del sustrato, el tipo de microscopio y la subjetividad del observador. Junto a ello la IFI es una técnica manual que requiere mucho tiempo. Por ello, surgieron los métodos alternativos de ELISA (cuya técnica viene detallada en el apartado 5.2.3.) que son automatizables, más rápidos y objetivos. En general, utilizan homogeneizados nucleares, mezclas de antígenos o una combinación de ambos y en menor número, una mezcla de antígenos recombinantes inmovilizados sobre placas (lo que lleva a la detección simultánea de un amplio espectro de especificidades)<sup>26</sup>. En los últimos años, han aparecido trabajos que comparan los resultados obtenidos mediante IFI y ELISA<sup>19, 27, 28</sup>. En general, puede considerarse que los ELISA poseen

una buena sensibilidad para la detección de ANA y un elevado valor predictivo negativo, por lo que pueden utilizarse para eliminar los especímenes sin ANA; no obstante, y debido a su bajo valor predictivo positivo los especímenes positivos deben volver a analizarse por IFI para determinar el resultado final.

Para terminar cabe señalar la utilidad, ampliamente demostrada, de un substrato especial, el hemoflagelado *Crithidia luciliae*<sup>29</sup>, para la determinación de anticuerpos anti-dsDNA. Este microorganismo posee una mitocondria gigante con dsDNA y relativamente libre de otros antígenos nucleares comunes como las histonas.

#### 2.4.4. INTERPRETACIÓN CLÍNICA Y VALOR DIAGNÓSTICO

El análisis de los ANA es un método de escrutinio poderoso y sensible en los pacientes en los que se sospecha una enfermedad autoinmune sistémica. En la Tabla 2-2, puede observarse que poseen una elevada prevalencia en estas enfermedades y que, en general, cuando no se detectan debe reconsiderarse el diagnóstico. Sin embargo, en la interpretación de un análisis de ANA debe tenerse en cuenta tanto la

**Tabla 2-2.**  
Prevalencia de ANA en las enfermedades autoinmunes sistémicas.

<b>Enfermedades autoinmunes sistémicas</b>	<b>ANA &gt; 1:320 (%)</b>
Lupus eritematoso sistémico	96
Lupus inducido por fármacos	100
Esclerodermia	97
Síndrome de Sjögren	90
Polimiositis/Dermatomiositis	78

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

concentración, como el patrón de tinción y los hallazgos clínicos. El umbral de decisión que se utilice tiene un gran impacto sobre el valor predictivo de la prueba, ya que las distribuciones de los ANA se superponen en las personas sanas y en las que sufren enfermedades autoinmunes sistémicas. En estudios de población se ha demostrado que la prevalencia de los ANA en las personas sanas se encuentra entre el 1 y el 15% con una media en torno al 6%. La mayoría de estos anticuerpos que se producen de forma natural son IgM y poseen una baja afinidad por su antígeno<sup>30, 31</sup>. La prevalencia de los ANA se incrementa con la edad, especialmente en el sexo femenino, de forma que un 38% de los ancianos con enfermedades



crónicas (edad media 82 años) poseen ANA, aunque habitualmente a títulos bajos (1:40 a 1:160)<sup>32</sup>. En los adultos, las mujeres tienen títulos ligeramente más elevados que los varones y sufren especialmente el efecto de la edad sobre el incremento de la prevalencia de los ANA<sup>33</sup>.

En un estudio reciente sobre valores de ANA en las personas sanas, se ha observado que la prevalencia se modifica notablemente de acuerdo con el límite de decisión (Tabla 2-3). De modo que si se toma como límite de decisión la dilución 1:40 se obtiene una elevada sensibilidad y una baja especificidad de la prueba, clasificando virtualmente a todos los pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas como poseedores de ANA. Cuando el límite de decisión se incrementa a la dilución 1:160 se obtiene una elevada especificidad y una baja sensibilidad, se confirma la presencia de enfermedad autoinmune sistémica en una porción de casos y se excluye el 95% de las personas sanas<sup>34</sup>. Por tanto, la especificidad de los ANA para las enfermedades autoinmunes sistémicas se incrementa conforme se incrementan los títulos, de forma que menos del 1% de las personas sanas poseen ANA con concentraciones mayores o iguales a 1:320<sup>35</sup>.

**Tabla 2-3.**  
Prevalencia de ANA en personas sanas.

Título	Prevalencia (%)
1:40	32
1:80	13
1:160	5
1:320	<1-3

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

La prevalencia de las enfermedades autoinmunes sistémicas y la metodología pueden influenciar de igual manera el valor predictivo de la prueba. En una población con una baja prevalencia de la enfermedad autoinmune un resultado positivo es con frecuencia un falso positivo. En atención primaria, el valor predictivo positivo de los ANA para las enfermedades autoinmunes sistémicas es de un 29%<sup>36</sup>. La metodología empleada para su detección modifica más dicho valor predictivo positivo, en general bajo, que el negativo de la prueba, que permanece más constante y próximo al 98-100%<sup>19</sup>. De cualquier modo, la elección del umbral de decisión depende del propósito de la prueba. Puede considerarse que el análisis de ANA es útil cuando se quiere confirmar el diagnóstico de una enfermedad autoinmune sistémica (sospecha

clínica alta), cuando se quiere excluir esa patología en casos en los que se la considere en el diagnóstico diferencial, aunque con una probabilidad baja, y es inútil, porque crea confusión y ansiedad, cuando se solicita de forma inadecuada, ya que es sensible y con un elevado valor predictivo negativo, aunque inespecífica<sup>37</sup>.

Un resultado positivo de ANA es compatible con una gran variedad de cuadros clínicos, que incluyen entidades nosológicas benignas secundarias a la administración de fármacos, como la procainamida, la hidralazina, la isoniazida, la clorpromacina, los  $\beta$ -bloqueantes, los anticonceptivos orales, el PAS, el propiltiouracilo, la fenotiazina y la oxifenacetina, entre otros, donde la prueba puede ser positiva hasta los 6-12 meses de terminar el tratamiento. También se ha llamado la atención sobre la aparición de ANA y sintomatología de LES con poliartritis en los pacientes tratados con minociclina para el acné<sup>38, 39, 40</sup>. Se detectan ANA en menos del 10% de los pacientes con erupciones polimórficas a la luz, sin que ello signifique progresión hacia un LES<sup>41</sup>. También, en los pacientes con enfermedades infecciosas agudas y crónicas, como la tuberculosis, la malaria, los abscesos, las endocarditis infecciosas subagudas, la lepra (30%), la mononucleosis infecciosa (65%) y las hepatitis víricas (23%). La presencia de ANA en los pacientes con hepatitis víricas crónicas parece potenciar la aparición de efectos secundarios dermatológicos y liquen plano en los pacientes tratados con interferón<sup>42</sup>. En las leucemias (20%), los linfomas, los tumores sólidos y la sarcoidosis, así como en los pacientes transplantados se desarrollan ANA, al igual que ocurre en las hepatopatías autoinmunes y otras enfermedades autoinmunes específicas de órgano como las tiroideas. En las colangitis autoinmunes, consideradas como un subgrupo de la cirrosis biliar primaria, se pueden detectar ANA, aunque no anticuerpos contra las mitocondrias<sup>43</sup>. En las embarazadas, se observa que los ANA están ligados con un incremento de la amenaza de aborto y pérdidas fetales repetidas<sup>44</sup>. Por último, se pueden observar ANA en el 22% de los pacientes con esclerosis múltiple, relacionándose con la actividad de la enfermedad, aunque no con la duración o incapacidad de la misma<sup>45</sup> e igualmente, en los pacientes con miastenia gravis (20%) y encefalitis alérgica.

Entonces, aunque las técnicas de determinación de ANA (IFI, ELISA) sean fiables como ayuda diagnóstica, el conocimiento, pues, de determinadas características mejoraran la interpretación de los resultados.

En primer lugar, como ya hemos visto, la elevada sensibilidad de las técnicas facilita la observación de ANA en pacientes afectados por una amplia gama de enfermedades reumáticas y sin ellas.

En segundo lugar, los ANA pueden ser negativos en determinados casos de LES y otras enfermedades autoinmunes que tienen anticuerpos restringidos a componentes citoplasmáticos. Dentro de estos se incluyen los antirribosomales, los anti-RNP citoplasmático, los antimitocondriales, los anti-Golgi, antifilamentos intermediarios y anticentriolos.

Finalmente, la determinación de ANA resulta de escasa utilidad para seguir la evolución del curso clínico de las enfermedades autoinmunes sistémicas debido a que está determinando anticuerpos de diversas especificidades y, por tanto, se aleja de la cuantificación de anticuerpos particularmente patogénicos (p. ej. en los casos de LES se suele protocolizar el control periódico de los anti-dsDNA y del complemento).

En conclusión, ante la sospecha de una enfermedad autoinmune sistémica sobre una base clínica (exploración, historia clínica) debe realizarse la determinación de ANA como ya se ha indicado en apartados anteriores, bien por ELISA como cribaje confirmando los positivos con IFI (lo que es una buena alternativa para laboratorios que realizan un gran número de determinaciones no abarcables por técnicas tradicionales)<sup>26</sup>, o bien directamente por IFI. Los resultados positivos deberán ser analizados posteriormente para caracterizar en lo posible su especificidad, según los patrones resultantes que determinarán las pruebas secundarias necesarias para llegar al diagnóstico.

## **2.5. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS**

La demostración de antígenos específicos ha permitido relacionar determinados anticuerpos con enfermedades concretas y así, por tanto, superar la sólo aproximada dependencia que podía apuntarse con los diferentes patrones de inmunofluorescencia<sup>18</sup>.

Una prueba positiva con un título significativo para los ANA por IFI deberá ir seguida del estudio de los anticuerpos específicos que la han ocasionado. Con la aplicación de diferentes técnicas se puede investigar si los anticuerpos detectados van dirigidos contra, entre otros, los siguientes antígenos: dsDNA (de doble cadena o nativo), Sm, U1-RNP, Ro (SSA), La (SSB), Scl-70, centrómero y Jo-1. Su estudio debe

estar apoyado por la presencia de manifestaciones clínicas propias de una enfermedad concreta en la que alguno o algunos de estos anticuerpos se consideran específicos. En la práctica se usa el término anti-ENA (*extractable nuclear antigen*), debido a la propiedad que tienen algunos autoantígenos de poder ser extraídos del núcleo con una solución salina, para designar el estudio de los antígenos: Ro (SSA), La (SSB), Sm y U1-RNP<sup>46</sup>. La negatividad de los ANA puede descartar virtualmente la presencia de anticuerpos con especificidades antigénicas, aunque también es cierto que su determinación, ya sea por IFI o ELISA, no detecta todos los conocidos<sup>18</sup>.

En este apartado se describen las técnicas usadas para la determinación de anticuerpos específicos útiles para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunes. Las técnicas más utilizadas son la inmunofluorescencia<sup>47</sup>, la inmunodifusión<sup>48</sup>, la aglutinación<sup>47</sup>, ELISA<sup>47</sup>, la inmunotransferencia<sup>47</sup> y la inmunoprecipitación<sup>47</sup>. Los resultados de estas pruebas de laboratorio se usan para confirmar o descartar un diagnóstico, subclasificar una enfermedad y monitorizar la actividad de la enfermedad. Sin embargo, pocas pruebas, o acaso ninguna, podrá satisfacer todos estos objetivos y los resultados deben ser interpretados con cautela.

Como característica universal, los métodos para detectar anticuerpos específicos usan antígenos como reactivos en el sistema analítico. La naturaleza del antígeno que se utiliza como reactivo define la especificidad de los anticuerpos que se detectan y se miden. Estos antígenos pueden ser preparaciones poco purificadas que contienen los antígenos de interés clínico, o moléculas recombinantes o altamente purificadas.

Los antígenos de interés clínico con frecuencia son moléculas altamente complejas, usualmente proteínas o glucoproteínas. Suelen tener varios epítomos diferentes que reaccionan con anticuerpos de las muestras de los pacientes. En general, la aplicación clínica de las pruebas que determinan anticuerpos específicos se encuentra directamente relacionada con la naturaleza de los antígenos utilizados como reactivos. La utilidad de las pruebas en las que se usan preparados de antígenos poco purificados o complejos (células enteras, cortes de tejidos) suele quedar limitada a pruebas de detección inicial (cribaje), mientras que las que usan antígenos recombinantes o altamente purificados detectan anticuerpos que son marcadores específicos de enfermedad.

La naturaleza del antígeno también influye en la precisión o exactitud de las pruebas para cuantificar el nivel o la concentración de anticuerpos específicos. La cuantificación con antígeno poco purificado tiende a ser semicuantitativa y algo imprecisa, y el resultado suele expresarse en forma de título. Por el contrario, con antígeno altamente purificado se obtienen anticuerpos específicos por cromatografía de alta afinidad, lo cual permite calibrar el sistema en unidades de masa ( $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo) o en unidades cuantitativas arbitrarias.

Los antígenos de interés pueden ser de naturaleza química variada e incluyen proteínas y glucoproteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y haptenos. Los métodos analíticos que se comentan a continuación se adaptan a antígenos que sean proteínas, glucoproteínas o ácidos nucleicos.

### **2.5.1. MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN**

Los métodos de precipitación<sup>47</sup> se usan en los laboratorios de inmunología clínica desde hace décadas para determinar tanto antígenos como anticuerpos específicos.

Estos métodos se basan en la reacción de precipitinas antígeno-anticuerpo originariamente descubierta por Heidelberg y Kendall. En este tipo de reacción, un antígeno multivalente reacciona con anticuerpos en una matriz fluida o semisólida, como un gel de agar, para formar una red insoluble de complejos antígeno-anticuerpo. La presencia de precipitina indica la presencia de anticuerpos frente a por lo menos uno de los antígenos del preparado antigénico. La precipitación tiene lugar dentro de un rango de concentraciones del antígeno y anticuerpo que se denomina punto de equivalencia. Si la concentración de cualquier de los reactantes es demasiado baja, no aparece ninguna línea de precipitación, pero si es demasiado elevada, la precipitación tampoco tiene lugar y se forman únicamente complejos solubles que no se visualizan. Este fenómeno se denomina "efecto prozona".

#### **2.5.1.1. INMUNODIFUSIÓN DOBLE**

La ID<sup>47</sup>, modificación de la técnica de inmunoprecipitación básica, se usa con frecuencia para la detección de anticuerpos específicos. En este caso, se coloca una dilución acuosa del reactivo con antígeno en el pozo central de una placa de gel de agar, mientras que el suero control positivo y las muestras que hay que determinar se colocan en pozos que lo rodean. Al cabo de 24-48 horas, durante las cuales los

antígenos y los anticuerpos habrán difundido a través del gel, se habrán formado líneas de precipitación que se observan visualmente. La especificidad del anticuerpo detectado en las muestras de los pacientes se evalúa examinando el patrón de convergencia entre las precipitinas desconocidas y las de los controles que contienen anticuerpos de especificidad conocida. Las distintas posibilidades, según el patrón de convergencia o cruce de las líneas de precipitación, son:

1. Identidad total (fusión).
2. Identidad parcial (fusión y punta).
3. No identidad (las líneas de precipitación se cruzan: doble punta).

Pueden darse resultados falsamente negativos si la concentración del antígeno no se ajusta de manera cuidadosa de forma que se consiga una zona de equivalencia con las concentraciones de los anticuerpos que se encuentran por lo habitual en las muestras de los pacientes. Además, con las muestras clínicas, aparecen múltiples líneas de precipitación de especificidad desconocida, que dificultan la identificación de anticuerpos específicos de interés clínico. Por último, el método de ID no puede detectar anticuerpos contra haptenos ni antígenos monovalentes, los cuales no forman redes insolubles con los anticuerpos específicos, dado que solo existe un epítipo por molécula de antígeno.

#### 2.5.1.2. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

La CIE<sup>47</sup>, en la cual se usa la electroforesis para incrementar el flujo de migración de antígeno y anticuerpos en la matriz de gel, es otra modificación de la técnica de inmunoprecipitación básica. Ajustando el pH de la solución tampón de la electroforesis, se consigue que el antígeno y los anticuerpos (específicos) migren en direcciones contrarias hacia el centro de la placa, en donde se producirá la inmunoprecipitación. La CIE es algo más sensible que la ID convencional, pero es técnicamente más compleja, aunque se sigue usando en algunos laboratorios de inmunología.

#### **2.5.2. AGLUTINACIÓN**

La aglutinación consiste en la agregación de partículas visibles, en una reacción antígeno-anticuerpo

para formar una masa más grande. El principio inmunológico de las reacciones de aglutinación es el mismo que el ya descrito de las reacciones de precipitación. Cuando ocurre reconocimiento antígeno-anticuerpo, seguido de unión, aparece la agregación visible de las partículas antigénicas. En ocasiones, la agregación es incompleta al fallar los puentes necesarios de anticuerpo entre partículas adyacentes de antígeno.

La determinación de anticuerpos específicos se realiza por aglutinación utilizando antígenos nativos insolubles como células bacterianas o eritrocitos, partículas recubiertas de antígeno como esferas de látex, o eritrocitos a los que se les ha adherido antígenos mediante acoplamiento químico. Los métodos de aglutinación requieren partículas estables sobre las cuales el antígeno se encuentra accesible, y una solución de reacción con la fuerza iónica y la viscosidad adecuadas para evitar la aglutinación incompleta. La mayoría de las pruebas de aglutinación disponibles en el mercado están diseñadas para detectar la especificidad de anticuerpos en suero (no plasma) o líquido cerebroespinal. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas viene condicionada por la pureza de los antígenos acoplados a las partículas insolubles.

En general, las ventajas de los métodos de aglutinación se basan en la facilidad del manejo: rapidez en la realización (usualmente requieren menos de 10 minutos), alto grado de sensibilidad analítica (comparable a los métodos inmunométricos, tal como se verá más adelante), y la enorme variedad de anticuerpos que pueden detectarse mediante este sistema. Además, excepto en el caso de aglutininas frías, estas pruebas no se afectan por la temperatura. Una de las mayores desventajas de los métodos de aglutinación es que las reacciones son únicamente semicuantitativas. Por ejemplo, aunque los resultados cualitativos son resultados altamente reproducibles, en la mayoría de los sistemas los resultados cuantitativos son exactos únicamente con una diferencia de cuatro veces el título de anticuerpos. La otra desventaja importante de los métodos de aglutinación es el fenómeno de prozona, en el que la aglutinación es inhibida por un exceso extremo de anticuerpo como consecuencia de una formación deficiente de malla.

Estas técnicas se usan de forma habitual en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, en transfusión para la tipificación de los eritrocitos, y en equipos comerciales para detectar autoanticuerpos en pacientes con enfermedades autoinmunes. Existen muchas pruebas diagnósticas basadas en aglutinación debido a su facilidad de producción. Por ejemplo, algunos eritrocitos, bacterias y hongos pueden ser aglutinados de forma directa por anticuerpos del suero. También se encuentran pruebas de aglutinación

indirectas en las que un amplio repertorio de antígenos solubles puede ser pasivamente absorbidos o acoplados químicamente a eritrocitos o partículas inertes (p. ej. esferas de látex).

### **2.5.3. MÉTODOS INMUNOMÉTRICOS (ELISA)**

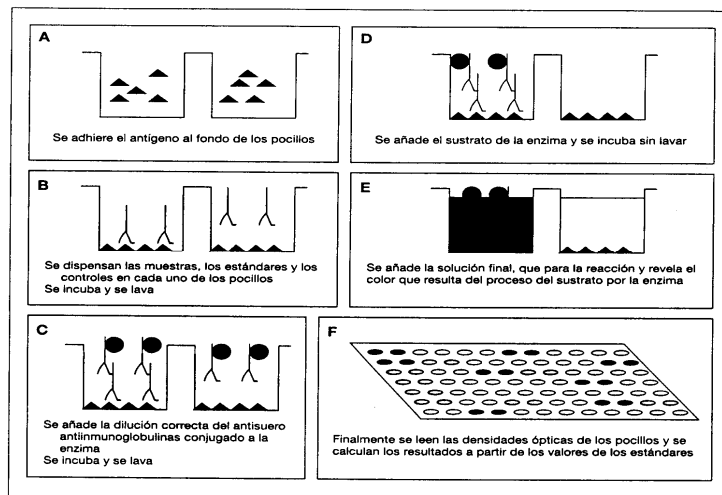
Los métodos inmunométricos son sistemas analíticos versátiles<sup>47</sup> y están ampliamente usados para la detección y medida de anticuerpos específicos. Estos métodos, que también se denominan inmunoanálisis en sándwich, usan un conjugado en fase sólida de antígeno (el inmunoabsorbente) para capturar anticuerpos específicos de las muestras de los pacientes (Figuras 2-2 y 2-3). Los anticuerpos específicos unidos al inmunoabsorbente en la primera fase del ensayo se detectan en la segunda fase mediante incubación con policlonales antiinmunoglobulinas humanas que han sido marcados con una enzima (enzimoinmunoanálisis), un radionúclido o una molécula luminiscente. En la fase final del ensayo, la cantidad de anticuerpo marcado que ha sido adherido al inmunoabsorbente se determina mediante la medida del producto coloreado o fluorescente generado por la enzima o de las radiaciones en contador de emisiones radiactivas.

Los métodos inmunométricos ofrecen diversas ventajas que motivan su popularidad. Se ha desarrollado toda una variedad de técnicas que adhieren antígenos de manera covalente o no covalente al inmunoabsorbente en fase sólida. Los métodos analíticos que se comentan a continuación se pueden adaptar a antígenos que sean proteínas, glucoproteínas o ácidos nucleicos.

Estos métodos pueden usar mezclas de antígeno nativo (no purificado) para pruebas de detección o bien antígenos altamente purificados para medir anticuerpos "marcadores" mediante ensayos cuantitativos. Los métodos inmunométricos son muy sensibles en comparación a las técnicas de precipitinas o de aglutinación. La sensibilidad analítica es del orden de 1 a 10 ng de proteína de anticuerpo por mililitro, lo cual es apropiado para medir los anticuerpos específicos de todas las subclases y los isotipos humanos, la IgE y las subclases de IgG incluidas. El incremento de sensibilidad analítica de las pruebas inmunométricas es en gran parte el resultado de la amplificación de la señal producida por la unión del anticuerpo antiinmunoglobulina marcado de la segunda fase. Tal como se ha señalado anteriormente, el anticuerpo usado en esta segunda fase está marcado con una enzima o un radionúclido. Las enzimas usadas, como es la fosfatasa alcalina, generan abundantes moles de producto cuantificable por cada mol de anticuerpo de



segunda fase unido al inmunoabsorbente, y los elementos radiactivos emiten radiaciones cuantificables que pueden contarse hasta un máximo de cuentas predeterminadas. La sensibilidad analítica de los métodos inmunométricos se encuentra primariamente limitada por la relación entre la unión específica y la inespecífica de inmunoglobulina en la primera fase del ensayo. Los inmunoabsorbentes con bajo nivel de unión inespecífica presentan la máxima sensibilidad analítica.



**Figura 2-2.** Esquema del ELISA.

El método inmunométrico más común para determinar anticuerpos específicos es un enzimoimmunoanálisis, el **ELISA** (Figura 2-2). En este método, un antígeno es absorbido de forma no covalente a los pozos de una *placa microtiter* de poliestireno u otro tipo de soporte sólido inerte. Se han elaborado varios tipos de placas de plástico para optimizar la adsorción de antígenos de diferentes naturalezas químicas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, proteínas y glucoproteínas incluidos, así como minimizar la unión inespecífica de inmunoglobulinas. Los ELISA pueden utilizarse para determinar anticuerpos específicos de forma cualitativa, o semicuantitativa mediante el uso de una curva estándar calibrada en unidades. Para las aplicaciones cualitativas, la absorbancia de los pozos incubados con suero diluidos de pacientes se compara con una reserva de sueros control negativos. Los resultados son positivos cuando las absorbancias resultan significativamente superiores a las de los sueros negativos, característicamente se consideran positivas si sobrepasan al menos el doble del nivel de absorbancia basal del control negativo.

En otros sistemas cualitativos se establece el grado de positividad mediante un suero estándar preestablecido que se corresponde con el límite entre negativo y positivo. En este caso los sueros positivos serán aquellos cuyas absorbancias sean iguales o superiores a la absorbancia del estándar (punto de corte o *cut off*). Para aplicaciones más cuantitativas, la absorbancia de los pozos correspondientes a los sueros de los pacientes se compara con una curva estándar, a partir de la cual se deducen las unidades correspondientes.

En cualquiera de las aplicaciones deben incluirse sueros control positivos y negativos en cada placa para asegurar que todas las fases del procedimiento se han realizado del modo adecuado. También existen limitaciones en la exactitud y en la precisión de las pruebas semicuantitativas realizadas por ELISA. Estos métodos son inherentemente variables, y las determinaciones seriadas de un mismo suero a menudo consiguen resultados que varían tanto como el 15-20%. Además, la curva estándar de absorbancia frente a cantidad de anticuerpo habitualmente no es lineal.

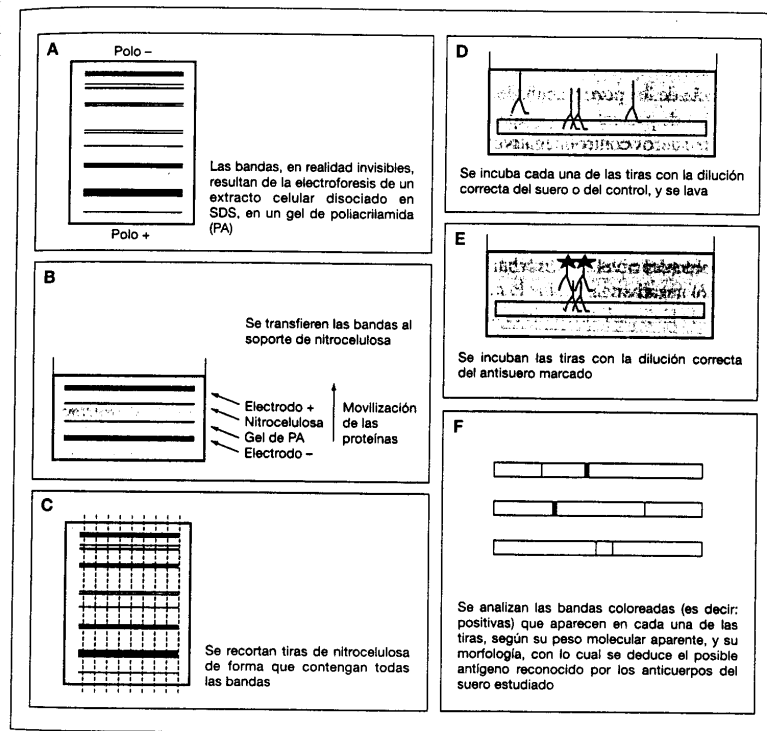
En consecuencia, aunque los resultados se entregan a menudo sobre la base de una escala continua en unidades, es mejor considerarlos semicuantitativos.

Habitualmente se interpreta, por lo tanto, que los resultados se sitúan dentro de unos márgenes (p. ej. negativo, dudoso, positivo débil y fuertemente positivo) con cada una de las categorías definidas por un margen de valores expresados en unidades.

El método de ELISA que se realiza en placas *microtiter* suele emplear, como se ha mencionado anteriormente, placas de plástico recubiertas de antígeno adsorbido de forma no covalente a la misma. En otras aplicaciones del método inmunométrico básico, el antígeno se acopla covalentemente a una fase sólida, como pueden ser discos de papel o partículas en suspensión, para preparar el inmunoadsorbente. Este sistema es particularmente habitual para los alérgenos usados para determinar anticuerpos IgE específicos. Las principales ventajas del acoplamiento covalente son que los inmunoadsorbentes antigénicos son indefinidamente estables y que los lotes sucesivos de inmunoadsorbente se caracterizan en términos bien caracterizados de cantidad de antígeno acoplado por gramo de fase sólida y de capacidad de captar anticuerpo de reserva de controles positivos. Sin embargo, existen las mismas limitaciones que se observan en cuanto a la exactitud y la precisión del método.

### 2.5.4. INMUNOTRANSFERENCIA O IMMUNOBLOT

En la inmunotransferencia (IT), los tejidos, las células o los núcleos<sup>47</sup> se disocian de forma que queden separadas todas sus estructuras en las moléculas mediante el uso de métodos disgregantes de los tejidos (ultrasonidos, triturado, etc.) y de detergentes en presencia de inhibidores de proteasas, para proteger la integridad de las proteínas.



**Figura 2-3.** Esquema de la inmunotransferencia.

La solución proteica resultante se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida con lo que quedarán separadas según sus pesos moleculares aparentes (Figura 2-3). Las proteínas separadas, distribuidas en bandas a lo largo de todo el gel, son transferidas a una lámina de nitrocelulosa. Ésta se recorta en tiras, de forma que cada una contenga toda la serie de bandas separadas. Cada tira, individualmente, puede ser incubada con un suero de pacientes que hay que analizar, y con los controles positivos y negativos correspondientes. Si los sueros analizados contienen anticuerpos capaces de reconocer alguna o algunas de las proteínas adheridas a la tira de nitrocelulosa, estos quedarán fijados a la banda. Posteriormente las tiras se lavan y, mediante el uso de un suero antiinmunoglobulinas humanas

conjugado a una enzima (habitualmente peroxidasa o fosfatasa), se detectan los posibles anticuerpos adheridos. El grado de actividad de la enzima que queda unida a la tira se revela mediante el método colorimétrico o lumínico que se considere más adecuado. De esta forma se visualizan las bandas reconocidas por anticuerpos de los sueros, y según su localización en el recorrido electroforético se deduce el peso molecular aparente, el cual sugiere a qué proteína o proteínas puede corresponder la banda reconocida.

### **2.5.5. INMUNOPRECIPITACIÓN**

Se usa una solución proteica semejante a la descrita en el primer paso de la IT<sup>47</sup>, pero en este caso las proteínas se marcan radiactivamente o con otros métodos. A continuación, se incuban alícuotas de dicha solución con los sueros a estudio y los controles en tubos separados. Luego se precipitan los inmunocomplejos presentes en cada muestra mediante la técnica elegida, por ejemplo, con enterotoxina de *Staphylococcus aureus* unidas a bolitas de sefarosa. Se lava el material precipitado, se disgregan los inmunocomplejos para obtener las proteínas individuales en solución y se procede a separar electroforéticamente los componentes proteicos de cada muestra en gel de poliacrilamida. Se identifica el peso molecular aparente mediante impresión de placas fotográficas debida a las radiaciones emitidas por las proteínas marcadas y presentes en el gel. Dicho peso molecular permite deducir qué proteínas fueron inmunoprecipitadas por los sueros correspondientes al comparar los patrones de bandas con los de los controles.

## **2.6. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS I. ANTICUERPOS CONTRA EL DNA**

### **2.6.1. DENOMINACIÓN**

Los anticuerpos contra el DNA pueden dividirse en dos categorías fundamentales: los que reaccionan con el DNA de cadena sencilla, DNA desnaturalizado, o ssDNA y los que reaccionan con el dsDNA o DNA nativo o de doble cadena, que también reaccionan con el ssDNA.

Los anticuerpos que reaccionan con el ssDNA se dirigen contra secuencias específicas de nucleótidos del DNA<sup>49</sup>. Estos anticuerpos contra el ssDNA son anticuerpos que pueden unirse también al dsDNA aunque con baja avidéz y por ello no pueden detectarse con algunas técnicas, como el método de Farr (radioinmunoanálisis). Los anticuerpos considerados como anti-dsDNA se dirigen contra el esqueleto azúcar-fosfato, reaccionan con mayor avidéz y son muy específicos del LES. La interacción de estos anticuerpos requiere flexibilidad en la hélice de DNA, de modo que pueda adoptar diferentes conformaciones para potenciar la unión al anticuerpo. Esto puede conseguirse pegando DNA de alto peso molecular a las fases sólidas, de modo que permanezcan ancladas, aunque libres, en el medio acuoso regiones del DNA capaces de adoptar cambios en su conformación. El anticuerpo interactúa con el DNA de forma bivalente, por lo que la flexibilidad de la conformación, tanto del DNA como del propio anticuerpo, potencia la interacción y genera interacciones de gran avidéz<sup>50</sup>.

### **2.6.2. PATOGENIA**

La producción de anticuerpos contra el dsDNA coincide con una activación concurrente de células T y B, lo cual sugiere que es un proceso dirigido por el antígeno y dependiente de células T en el que los anticuerpos se van seleccionando activamente para su unión al antígeno<sup>51</sup>.

Existen numerosos receptores celulares que pueden ser responsables de los diferentes comportamientos que tienen los anticuerpos contra el dsDNA. Estos pueden encontrarse en la membrana celular donde promueven la citólisis a través de la adición del complemento hemolítico o pueden penetrar y adquirir una localización citoplasmática o nuclear inhibiendo la síntesis proteica y ocasionando una disfunción celular<sup>52</sup>.

Clínicamente, existe una relación directa entre la presencia de anticuerpos contra el dsDNA y la actividad clínica del LES, de forma que las recaídas suelen ir precedidas de un aumento de su concentración, seguido por una fuerte caída durante la exacerbación clínica. Por ello en el LES deben medirse regularmente los anticuerpos frente al dsDNA, con preferencia cada 6 semanas, considerándose un incremento cuando la concentración supera un 25% la del espécimen anterior<sup>53</sup>. Otra prueba que señala el efecto patógeno de los anticuerpos contra el dsDNA es que se pueden aislar a partir de órganos

lesionados en el LES. Bien por una interacción directa con estructuras tisulares, como el heparán sulfato, o a través de la unión mediada por nucleosomas, la activación del complemento conduce a los hechos característicos de la enfermedad y especialmente a las lesiones renales. La nefritis lúpica se correlaciona especialmente con los anticuerpos contra el dsDNA (anticuerpos anti-DNA de elevada avidéz<sup>54</sup>), mientras que la implicación del sistema nervioso central lo hace con los anticuerpos contra el DNA de baja avidéz.

### 2.6.3. UTILIDAD CLÍNICA

Estos anticuerpos son frecuentes en el LES y en otras enfermedades autoinmunes sistémicas, como la artritis reumatoide, la esclerodermia, es síndrome de Sjögren y el lupus inducido por fármacos, la mononucleosis infecciosa, las hepatitis crónicas activas, las glomerulonefritis crónicas y la cirrosis biliar primaria. Su marcada heterogeneidad y su distribución ubicua en las enfermedades inflamatorias hacen que su utilidad clínica sea limitada. Los anticuerpos contra el esqueleto azúcar-fosfato que reaccionan con el dsDNA son muy específicos del LES y permiten monitorizar el curso clínico de la enfermedad en aquellos pacientes en los que son positivos.

En general, los anticuerpos que poseen mayor interés clínico son los de la clase IgG. Cuando el paciente posee anticuerpos contra el dsDNA de la clase IgM tiene menos riesgo de sufrir afectación renal<sup>55</sup>. Mientras que los anticuerpos de la clase IgA, detectados en el 19.9% de los pacientes con LES, si se asocian con los de la clase IgG y con indicadores de actividad como la disminución de C3 e incremento de la velocidad de sedimentación globular mejoran el diagnóstico del fenotipo de la nefritis lúpica<sup>56</sup>.

### 2.6.4. MÉTODOS DE MEDIDA

Los anticuerpos contra el DNA pueden determinarse por muchos métodos, incluso los inmunoanálisis de flujo, aunque los más utilizados son el radioinmunoanálisis (técnica de Farr), la IFI usando como substrato *Crithidia luciliae* y los ELISA.

Los ELISA poseen una muy buena sensibilidad pero una baja especificidad. Detectan anticuerpos de alta y baja avidéz que se consideran poco relevantes para el proceso de la enfermedad. Cuando se utilizan,

pues, como método de selección para el diagnóstico de LES, debe utilizarse también uno de los otros dos que permita incrementar su especificidad detectando anticuerpos con una mayor avidéz.

## **2.7. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS II. ANTICUERPOS CONTRA HISTONAS Y NUCLEOSOMAS**

### **2.7.1. DENOMINACIÓN**

Las histonas son proteínas básicas que se unen al DNA para formar los nucleosomas, las unidades básicas de la cromatina. El nucleosoma está formado por un núcleo proteico de histonas sobre el que se enrolla el DNA y otras histonas que actúan de puente entre un nucleosoma y otro. El núcleo está formado por una zona central en la que dos moléculas de histonas H3 y otras dos de H4 forman un tetrámero. Este tetrámero está flanqueado por dos dímeros formados por una histona H2A y otra H2B (H2A-H2B). En total forman un octámero sobre el que se enrolla el DNA dando dos vueltas. Las histonas interaccionan entre sí por sus dominios globulares, mientras que sus segmentos básicos amino terminales quedan hacia fuera y son los que interaccionan con el DNA. Las histonas H1 y otras histonas de unión como la H1<sup>o</sup> o la H5, se asocian a través de su dominio globular con el núcleo del nucleosoma en los puntos de entrada y salida del DNA.

Los anticuerpos contra el nucleosoma pueden unirse al dsDNA libre, aunque con menor afinidad y avidéz. De modo que parece que existe cierto solapamiento entre los anticuerpos contra el DNA y los anticuerpos contra los nucleosomas<sup>57</sup>.

### **2.7.2. PATOGENIA**

Los nucleosomas quedan expuestos al sistema inmunitario en el proceso de apoptosis o muerte celular programada; son muy inmunógenos y está demostrado que las células activadas frente a los mismos estimulan la secreción de anticuerpos contra ellos y también contra el DNA y las histonas<sup>58</sup>. Los

nucleosomas, pues, pueden actuar de una manera bipotencial como dianas antigénicas y como generadores de anticuerpos contra el DNA y contra las histonas<sup>59</sup>.

Por reagrupamiento de los genes de las inmunoglobulinas pueden generarse células B autorreactivas frente a los nucleosomas. Las células B pueden, entonces, actuar como células presentadoras de antígeno para las células Th específicas para ellos. La cooperación entre las células B y T reactivas frente a los nucleosomas puede expandir las células B autoinmunitarias, lo que lleva a una maduración de la afinidad de los anticuerpos que producen contra los mismos. Al mismo tiempo, las mutaciones somáticas en las regiones variables de estos anticuerpos, pueden generar, al menos en parte, anticuerpos contra el DNA<sup>57</sup>.

En el torrente sanguíneo de los pacientes con LES pueden detectarse estructuras similares a los nucleosomas. Además, en el lupus hay una selección tímica y una expansión periférica de células T específicas para los nucleosomas<sup>60</sup>. En el riñón, las histonas o las histonas acomplejadas con el DNA, pueden formar depósitos glomerulares en virtud de la interacción entre las histonas catiónicas y el heparán sulfato presente en la membrana basal glomerular. De hecho, el 75% de las biopsias renales de los pacientes con LES presentan estos depósitos. La presencia de histonas o de nucleosomas es esencial para la deposición de sus anticuerpos y de los anticuerpos contra el DNA en el riñón, y su afectación en el LES<sup>57, 61, 62</sup>.

### **2.7.3. UTILIDAD CLÍNICA**

Los anticuerpos contra las histonas se describieron por primera vez en 1957 y son unos anticuerpos típicos, tanto del LES (especialmente contra histona H1) como del lupus inducido por fármacos (particularmente contra H2A y H2B)<sup>63</sup>.

Se han descrito tanto reactividades a las histonas libres como a los complejos de histonas (sobre todo frente a la subpartícula H2A-H2B-DNA).

También se pueden demostrar anticuerpos antihistonas en la artritis reumatoide, la esclerodermia, las vasculitis, la artritis juvenil idiopática y la hepatitis autoinmune.



#### **2.7.4. MÉTODOS DE MEDIDA**

Los métodos más recomendados para la determinación de estos anticuerpos son la inmunotransferencia y el enzimoimmunoanálisis. Además, los anticuerpos antihistonas pueden determinarse también por IFI, aunque se trata de una técnica excesivamente laboriosa, siendo el patrón habitualmente homogéneo y su diana, fundamentalmente, el complejo H2A-H2B-DNA.

### **2.8. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS III. ANTICUERPOS CONTRA LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS**

Las partículas de ribonucleoproteínas están compuestas por una o más moléculas de RNA que se asocian con una o más proteínas. Del total de ribonucleoproteínas descritas destacan tres grupos, las ribonucleoproteínas citoplasmáticas de pequeño tamaño (scRNP), que incluyen RNA transcrito por la RNA polimerasa III, las ribonucleoproteínas nucleares de pequeño tamaño (snRNP), que incluyen RNA transcrito por la RNA polimerasa II y las ribonucleoproteínas de pequeño tamaño del nucleolo (snoRNP), con RNA transcrito por la RNA polimerasa I.

#### **2.8.1. ANTICUERPOS CONTRA Ro/SSA**

##### 2.8.1.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA

El antígeno Ro/SSA es una ribonucleoproteína incluida dentro de las scRNP y compuesta por un RNA citoplasmático de pequeño tamaño (hYRNA) y un péptido de 52, 54 o 60 kDa (los más importantes desde un punto de vista clínico son el de 52 y el de 60). Estas partículas existen en la mayoría de los tejidos y células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos, plaquetas), aunque con modificaciones de su estructura y cantidad, tanto entre los diferentes tejidos, como entre las diferentes especies y estados evolutivos. Su función, en gran medida, se desconoce, aunque su capacidad para unir los ácidos nucleicos y el hecho de que comparta homología con las proteínas de regulación de los genes, sugiere que pueda participar en el

proceso de transcripción del RNA. Se ha comprobado, además, que los anticuerpos contra Ro/SSA reaccionan con epítomos conformacionales.

#### 2.8.1.2. PATOGENIA

Diversos factores como la luz ultravioleta y las infecciones víricas pueden provocar una translocación del complejo Ro/SSA a la membrana favoreciendo el desarrollo de una respuesta autoinmunitaria. Los anticuerpos que se generan son policlonales con representación de todas las clases de IgG. La interacción de los anticuerpos séricos con los antígenos expresados en la membrana de los queratinocitos parece inducir lesiones cutáneas a través de los mecanismos citotóxicos celulares dependientes de anticuerpos<sup>64</sup>.

Las pruebas clínicas que apuntan a la patogenicidad de estos anticuerpos radican en la transferencia de IgG contra Ro/SSA y contra La/SSB desde la madre al feto con la génesis de bloqueo cardiaco congénito, en la presencia de depósitos inmunitarios en tejidos afectados y en la presencia de linfocitos B reactivos en las glándulas salivares y sangre periférica de los pacientes con síndrome de Sjögren con enfermedad severa y elevado grado de infiltración de dichas glándulas<sup>65</sup>. No obstante, no todos los recién nacidos de madres que poseen estos anticuerpos desarrollan el bloqueo cardiaco, por lo que deben existir otros factores, entre los que se incluye una especial configuración genética y la asociación con determinados antígenos de histocompatibilidad.

#### 2.8.1.3. UTILIDAD CLÍNICA

En las mujeres fértiles la prevalencia de los anticuerpos contra Ro/SSA es de un 1%. Otros autores destacan que cuando se detectan por una técnica más sensible puede llegar a un 17%. Por ello, un buen número de pacientes con estos anticuerpos pueden no tener enfermedad.

En promedio se puede considerar que su prevalencia es de hasta un 90% de los pacientes, según técnicas, con síndrome de Sjögren<sup>65</sup>. De hecho, los pacientes con anticuerpos positivos presentan un curso más severo de la enfermedad. Además, se detectan en el 30-60% de los pacientes con LES<sup>66</sup>, el 70-90% con lupus cutáneo subagudo<sup>66, 67</sup> y más del 90% de niños con lupus neonatal<sup>68</sup>. En el 15-20% de los pacientes con esclerosis sistémica progresiva, el 10% con artritis reumatoide y menos del 10% de los pacientes con polimiositis y cirrosis biliar primaria pueden detectarse anticuerpos contra Ro/SSA. En el LES

se asocian con fotosensibilidad<sup>66, 67</sup>, síndrome seco<sup>66, 67</sup>, trombocitopenia<sup>67</sup>, linfopenia, erupciones cutáneas, neumonitis intersticial, déficit de C2 o C4. Sólo una de cada 50 mujeres con lupus portadoras de anticuerpos contra Ro/SSA tiene hijos con bloqueo cardíaco congénito con un riesgo del 2%, aumentando hasta un 10-17% en los siguientes embarazos<sup>68</sup>.

En general, las concentraciones de estos anticuerpos en el síndrome de Sjögren y en el LES fluctúan durante el curso de la enfermedad, pero con la excepción de los pacientes que padecen vasculitis cutánea, no fluctúan en paralelo con la actividad de la misma y, además, no cambia la especificidad de los anticuerpos contra Ro/SSA de 52 o 60 kDa durante su curso<sup>69</sup>. En los pacientes con miositis se ha observado que su presencia se asocia con anticuerpos contra las aminoacil-tRNA sintetasas, partícula de reconocimiento de la señal y PM/Sci<sup>70</sup>.

#### 2.8.1.4. MÉTODOS DE MEDIDA

Para detectar los anticuerpos contra Ro/SSA pueden utilizarse varios métodos de rutina como la ID, la CIE, los ELISA y la IT, siendo los enzimoimmunoanálisis en general la técnica más utilizada con una buena sensibilidad y especificidad<sup>27</sup>. Pueden usarse antígenos de 52 o 60 kDa naturales o recombinantes. Los antígenos purificados deben proceder del ser humano y se obtienen del bazo o de líneas celulares, ya que existen diferencias entre las especies. Los antígenos recombinantes y las técnicas que los utilizan inmovilizados sobre membranas de nylon presentan una buena sensibilidad clínica con una conformación estructural bien conservada<sup>71</sup>.

### **2.8.2. ANTICUERPOS CONTRA La/SSB**

#### 2.8.2.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA

El antígeno La/SSB es una fosfoproteína que se une a pequeños RNA transcritos por la RNA polimerasa III, entre ellos los RNA citoplasmáticos (hYRNA) de la ribonucleoproteína Ro. La proteína La/SSB es predominantemente nuclear, aunque también se observa en el citoplasma. Se une transitoriamente a los hYRNA y a la proteína Ro formando una única partícula de ribonucleoproteína, lo que podría explicar la frecuente coincidencia de anticuerpos contra Ro/SSA y contra La/SSB en el mismo

paciente. La proteína La realiza diferentes funciones relacionadas con la transcripción y sus epítomos son fundamentalmente, y al igual que ocurre con la proteína Ro, de conformación.

#### 2.8.2.2. PATOGENIA

Los anticuerpos contra La/SSB están prácticamente siempre acompañados por anticuerpos contra Ro/SSA, por ello es difícil de determinar si uno o la combinación de los dos es la patogénica.

Se ha observado que ambos antígenos se encuentran en la superficie de las fibras del corazón afectado de bloqueo cardíaco congénito y que la inmunización de animales con anticuerpos monoclonales contra la proteína La/SSB provoca la aparición de una respuesta ampliada a otros epítomos de ella y también contra componentes de Ro/SSA<sup>72</sup>. Los anticuerpos son fundamentalmente del isotipo IgG.

#### 2.8.2.3. UTILIDAD CLÍNICA

Los anticuerpos contra La/SSB se detectan en el 85-90% de los pacientes con síndrome de Sjögren primario y en el 50-60% de los pacientes con secundario, cuando se miden con técnicas sensibles como el ELISA. Son muy específicos de la enfermedad y se asocian con manifestaciones extraglandulares como vasculitis, púrpura, afectación neurológica central y periférica, miositis, linfadenomegalia, leucopenia trombocitopenia, hipergammaglobulinemia y factor reumatoide<sup>35</sup> y afectación glandular más severa.

En el LES aparecen en un 10-15%<sup>66</sup> de los pacientes y se asocian con menor prevalencia de afectación renal y anticuerpos contra dsDNA. En algunos casos, incluso, parecería que una población de anticuerpos contra La/SSB y Ro/SSA fuese contra el idiotipo para los anticuerpos contra el dsDNA. Los anticuerpos contra La/SSB y Ro/SSA se detectan en más del 95% de las madres de hijos que desarrollan lupus neonatal, estas pacientes tienen una mayor probabilidad de desarrollar enfermedades autoinmunes sistémicas (síndrome de Sjögren, LES, indiferenciadas), aunque no predice necesariamente su desarrollo<sup>73</sup>. En un 25-35% de los pacientes con lupus eritematoso cutáneo subagudo, además de anticuerpos contra Ro/SSA, pueden detectarse contra La/SSB.

#### 2.8.2.4. MÉTODOS DE MEDIDA

Pueden utilizarse antígenos purificados humanos o antígenos recombinantes. Los métodos de ELISA

y de IT presentan una mayor sensibilidad que la CIE. En esta última se producen resultados falsos negativos debido a la existencia de anticuerpos no precipitantes.

Diferentes estudios publicados demuestran que las técnicas de ELISA, IT y aquellas que inmovilizan el antígeno sobre una membrana de nylon poseen una buena sensibilidad y especificidad y una buena concordancia entre los resultados obtenidos por las diferentes técnicas<sup>71, 74</sup>.

### **2.8.3. ANTICUERPOS CONTRA UsnRNP**

#### 2.8.3.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA

Las partículas de ribonucleoproteínas de pequeño tamaño con abundante uracilo (UsnRNP) están formadas por polipéptidos y moléculas de RNA de pequeño tamaño con abundante uracilo (UsnRNA) transcritas, en general, por la RNA polimerasa II.

Los UsnRNA poseen varios lugares de interacción con otros RNA y proteínas. Mediante un lugar con abundante uracilo (dominio A) se une a un grupo de péptidos comunes a para todas las UsnRNP que se denominan B/B', D, E, F y G. Se hallan muy conservados evolutivamente y constituyen la diana de los anticuerpos contra Sm. Además, existen unos péptidos que se unen de manera específica a cada UsnRNA para formar las diferentes UsnRNP (Tabla 2-4). Aunque hay descritas más de 10 UsnRNP las de mayor interés clínico en las enfermedades autoinmunes sistémicas son la U1snRNP y las U2snRNP y en mucha menor medida las U5snRNP y las U4snRNP/Us6nRNP.

En las partículas U1snRNP se ha considerado que los anticuerpos se dirigen fundamentalmente contra los péptidos de 70 kDa y 33 kDa (péptido A), aunque un estudio en el ser humano ha demostrado que a diferencia de lo que ocurre en el ratón, los sueros contra U1snRNP con frecuencia reaccionan también contra el péptido C (22 kDa)<sup>75</sup>. Se consideran anticuerpos contra U1snRNP a aquellos que reconocen a los epítomos específicos de la partícula U1snRNP, aunque de forma tradicional se les ha denominado RNP o U1-RNP. Lo mismo ocurre con el resto de los anticuerpos dirigidos contra los componentes específicos de cada una de las ribonucleoproteínas. Los anticuerpos que se dirigen contra el núcleo proteico común son los incluidos en el término anticuerpos contra Sm.

**Tabla 2-4.**

Características de las partículas de ribonucleoproteínas nucleares de pequeño tamaño ricas en uracilo (UsnRNP) de mayor interés clínico.

<b>Partícula</b>	<b>Tamaño</b>	<b>RNA (pb)</b>	<b>RNA polimerasa</b>	<b>Proteínas específicas</b>
U1 snRNP	12 S	164	II	70 kDa, A, C
U2 snRNP	17 S	188	II	A', B', otras 9
U5 snRNP	20 S	115	II	8 proteínas
U4/U6 snRNP	12 S			150 kDa
U4 snRNP		145	II	
U6 snRNP		108	III	

pb = pares de bases, U4 snRNP y U6 snRNP se unen formando una única partícula U4/U6 snRNP. Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

### 2.8.3.2. PATOGENIA

Se ha observado que los anticuerpos contra U1snRNP pueden penetrar en las células vivas y alcanzar su núcleo, donde pueden provocar apoptosis<sup>76</sup>. Por otra parte, se ha sugerido que la respuesta autoinmunitaria inicialmente se origina como una respuesta contra los polipéptidos específicos de la U1snRNP y luego implica a los comunes, lo que justificaría la existencia de anticuerpos contra U1snRNP aislados o asociados con Sm y la práctica ausencia de anticuerpos exclusivamente contra Sm<sup>77</sup>. Los anticuerpos contra las UsnRNP son de clase IgG fundamentalmente del subtipo IgG1.

### 2.8.3.3. UTILIDAD CLÍNICA

Los anticuerpos contra Sm se asocian con anticuerpos contra UsnRNP y se detectan, en general, en el 30% de los pacientes con LES, son muy específicos y su presencia se ha incluido como uno de los criterios diagnósticos. Son más frecuentes en asiáticos y africanos que en los europeos, lo cual sugiere una asociación genética. Aunque muy importantes para el diagnóstico, no se han asociado de forma clara con la actividad de la enfermedad o con manifestaciones específicas del LES<sup>78</sup>.

Los anticuerpos contra U1snRNP cuando se presentan solos y a concentraciones elevadas identifican a un subgrupo de pacientes con sintomatología de LES, esclerosis sistémica y miositis-dermatomiositis, lo que recibe el nombre de enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC)<sup>79</sup>. En los pacientes con LES se

desarrollan en el 30-40% y son poco frecuentes en la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren, la esclerodermia y la polimiositis.

Los anticuerpos contra U2snRNP se encuentran en alrededor del 15% de los pacientes con EMTC y con una frecuencia parecida en los pacientes con LES, especialmente cuando presentan síntomas de solapamiento con esclerosis sistémica y polimiositis<sup>77</sup>.

Los anticuerpos dirigidos contra el resto de las UsnRNP se han descrito en escasas ocasiones en pacientes aislados.

#### 2.8.3.4. MÉTODOS DE MEDIDA

Puede descartarse su presencia mediante IFI, en la que se observa un patrón moteado.

Su determinación se realiza por CIE, ID o ELISA, diferenciando los UsnRNP de los Sm, sin ser posible diferenciar U1snRNP de U2snRNP.

Hay que tener en cuenta que los anticuerpos contra U1snRNP específicos se unen débilmente también a los péptidos B de Sm, por lo que se considera que los anticuerpos contra el péptido D son más específicos cuando se estudia una respuesta frente a Sm.

## **2.9. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IV. ANTICUERPOS CONTRA EL CENTRÓMERO**

### **2.9.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA**

Los anticuerpos contra el centrómero (ACA) se dirigen contra tres tipos fundamentales de proteínas llamadas CenpA (17 kDa), CenpB (60 kDa) y CenpC (140 kDa). Con menos frecuencia estos anticuerpos se unen a otras proteínas centroméricas (CenpD, CenpE y CenpF).

Estas proteínas centroméricas son las que en el cinetocoro deben asociarse con la secuencia centromérica del DNA permitiendo que dicha molécula de DNA se una al huso mitótico durante la división celular.

### **2.9.2. PATOGENIA**

Los ACA son principalmente de la clase IgG y fundamentalmente del subtipo IgG1. El principal antígeno es la proteína CenpB, en la que hay al menos 5 epítomos, algunos compartidos con otras proteínas centroméricas. No se conoce si la reactividad frente a las diferentes proteínas tiene alguna relevancia clínica.

### **2.9.3. UTILIDAD CLÍNICA**

Los ACA se detectan en el 3% de los sueros con ANA, especialmente en los pacientes con una esclerosis cutánea limitada, calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia (síndrome de CREST), en donde la detección se eleva hasta el 70-90%<sup>80</sup>, siendo menos frecuente (20-30%) en los pacientes con esclerodermia difusa<sup>81</sup>.

El porcentaje de pacientes con ACA se incrementa conforme lo hace el número de síntomas clínicos propios del síndrome de CREST. Se asocian con el fenómeno de Raynaud primario (32%) y secundario (21%), en los pacientes en los que parece incrementarse el riesgo de desarrollar una esclerodermia limitada.

Se han detectado también ACA en el síndrome de Sjögren, la cirrosis biliar primaria y la artritis reumatoide. Casi todos los pacientes con ACA tienen fenómeno de Raynaud<sup>78</sup>.

### **2.9.4. MÉTODOS DE MEDIDA**

En IFI producen un patrón punteado difuso en las células en interfase, mientras que en las células en división se encuentran en la placa de metafase.

La IT permite distinguir entre las diferentes proteínas centroméricas. Pueden utilizarse proteínas purificadas o recombinantes<sup>71</sup>.

Los ELISA poseen mejor sensibilidad que la IFI, aunque pueden presentar diferencias significativas entre sus resultados<sup>27</sup>.



## **2.10. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS V. ANTICUERPOS CONTRA LA TOPOISOMERASA I**

### **2.10.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA**

La topoisomerasa I (topo I) es una enzima nuclear que cataliza la conversión entre las diferentes formas de DNA (relajación de la superhélice de DNA) por medio de una rotura transitoria de su cadena sencilla y su nueva unión. Los anticuerpos contra la topo I (Scl-70) reconocen múltiples epítomos, aunque existe uno de conformación inmunodominante contra el que reaccionan el 98% de los sueros con anticuerpos contra Scl-70<sup>82</sup>.

### **2.10.2. PATOGENIA**

Los anticuerpos son fundamentalmente de las clases IgG e IgA y en menor medida IgM. La actividad de la enzima se inhibe por la unión de los anticuerpos<sup>83</sup>. Los anticuerpos contra Scl-70 se asocian con DRB1\*1104<sup>84</sup>, siendo esta asociación un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis pulmonar en los pacientes con esclerodermia difusa.

### **2.10.3. UTILIDAD CLÍNICA**

Los anticuerpos contra Scl-70 son muy específicos de la esclerodermia (especificidad del 99.6%) y, en concreto de la forma difusa de la enfermedad<sup>85</sup>.

El 40% de los pacientes con esclerodermia difusa poseen anticuerpos contra Scl-70. La prevalencia disminuye en la forma localizada (10%)<sup>85</sup>. Estos pacientes poseen con mayor frecuencia una implicación cutánea difusa y un incremento de la frecuencia de fibrosis intersticial y enfermedad vascular periférica. Algunos estudios han demostrado una asociación significativa entre la presencia de estos anticuerpos y el cáncer o futuro desarrollo de él<sup>72</sup>.

#### **2.10.4. MÉTODOS DE MEDIDA**

Durante muchos años el método más utilizado ha sido la ID utilizando como antígeno un extracto nuclear. Hoy día, los enzimoimmunoanálisis y la IT se comportan de modo adecuado, en cuanto a sensibilidad y especificidad<sup>27</sup>, con una buena concordancia entre técnicas que utilizan antígenos nativos y recombinantes<sup>71</sup>.

### **2.11. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS VI. ANTICUERPOS CONTRA EL NUCLEOLO**

#### **2.11.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA**

Son un grupo heterogéneo de anticuerpos frente a diversos antígenos nucleolares. Se han reconocido los anti-Scl 70, anteriormente citados, los anti-PM/Scl, los anti-RNA polimerasa I, II y III, los anti-U3-RNP (antifibrilarina), los anti-NOR 90, los anti-proteína Th, y otros más raros<sup>63</sup>.

#### **2.11.2. UTILIDAD CLÍNICA**

Los anticuerpos contra el nucleolo son muy específicos de la esclerodermia, aunque se detectan en un porcentaje bajo (8-40%)<sup>86</sup>. Los anticuerpos contra la RNA polimerasa I y III se detectan en el 20% de los pacientes con esclerodermia, al igual que los antifibrilarina; todos ellos en la forma difusa de la enfermedad, mientras que los anti-proteína Th se asocian a la forma limitada<sup>87</sup>. Los anti-PM/Scl se asocian con síndromes de solapamiento poliomiositis/esclerodermia. Los anticuerpos antinucleolares también se han detectado en pacientes con LES, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y fenómeno de Raynaud. La implicación seria de vísceras es menos frecuente y la supervivencia a los 10 años es mayor en estos pacientes<sup>78</sup>.

### **2.11.3. MÉTODOS DE MEDIDA**

Los patrones que se observan en IFI aparecen representados en la Tabla 2-1, aunque, en general, siguen un patrón nucleolar. Las técnicas de IT e inmunoprecipitación permiten identificar las diferentes especificidades.

## **2.12. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS VII. ANTICUERPOS CONTRA LAS AMINOACIL tRNA SINTETASAS**

Las aminoacil tRNA sintetasas son enzimas citoplasmáticas que catalizan la esterificación de un aminoácido a su RNA de transferencia (tRNA), es decir, cargan al tRNA con su aminoácido específico para la síntesis proteica<sup>88</sup>.

### **2.12.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA**

Hasta el momento, se han detectado anticuerpos contra 6 de estas enzimas (sintetasas de histidina, treonina, alanina, glicina e isoleucina, y SRP o partícula de reconocimiento de señal). El antígeno más frecuente es la sintetasa de histidina, la histidil tRNA (his-tRNA) sintetasa, también llamada autoantígeno Jo-1. Su principal epítipo se encuentra en la región amino terminal de la proteína, es esencial para su función y lo comparte con otras aminoacil tRNA sintetasas.

### **2.12.2. PATOGENIA**

Los estudios sobre el antígeno principal de la his-tRNA sintetasa han demostrado que tiene una configuración que se asemeja al extremo amino de la serina tRNA sintetasa de origen bacteriano. Probablemente este epítipo es el antígeno inicial contra el que se dirige la respuesta autoantigénica que se lleva y amplía posteriormente a otros autoantígenos. Los autoanticuerpos que se originan son fundamentalmente de la clase IgG y principalmente IgG1, con una pequeña proporción de IgG3 e IgM.

### **2.12.3. UTILIDAD CLÍNICA**

Los anticuerpos anti-aminoacil tRNA sintetasa son específicos de la poliomiositis/dermatomiositis, aunque tienen el inconveniente de su baja sensibilidad, siendo su prevalencia del 15% en las miositis inflamatorias y del 30% en la poliomiositis/dermatomiositis.

De todos ellos los más frecuentes son los que se dirigen contra la his-tRNA sintetasa (anti-Jo-1) con una prevalencia de un 18-20% en las poliomiositis/dermatomiositis, el resto son poco frecuentes. En general, suelen estar presentes al inicio clínico de la enfermedad y se correlacionan con la actividad de la misma.

Los pacientes poseen una clínica característica conocida como síndrome antisintetasa<sup>89</sup> que incluye miositis, enfermedad pulmonar intersticial, artritis, fenómeno de Raynaud y manos de mecánico (alteración descrita como líneas hiperqueratósicas con fisuras en los bordes de los dedos).

### **2.12.4. MÉTODOS DE MEDIDA**

Los anticuerpos contra las aminoacil tRNA sintetasa exhiben un patrón de fluorescencia citoplasmática en las células Hep-2 y en los cortes de tejido. No obstante, un 45% de los anticuerpos contra la his-tRNA sintetasa son negativos en IFI, especialmente cuando las concentraciones son bajas o existe un número limitado de especificidades. Sin embargo, los ELISA son más específicos contra estos últimos, mientras que la IFI es más general y detecta anticuerpos contra antígenos específicos e inespecíficos de la poliomiositis. Cuando se desea estudiar anticuerpos contra otras aminoacil tRNA sintetasa es preciso recurrir a técnicas no comerciales de enzimoanálisis, IT o inmunoprecipitación.

## **2.13. ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEÍNAS CIRCULANTES**

### **2.13.1. INTRODUCCIÓN**

En algunas enfermedades autoinmunitarias se observa la presencia en suero de anticuerpos contra proteínas circulantes. Los principales autoanticuerpos de esta clase son los factores reumatoideos y los

anticuerpos contra los fosfolípidos. Otras proteínas patológicas presentes en el suero en puntuales enfermedades autoinmunitarias son las crioglobulinas y los inmunocomplejos circulantes.

### **2.13.2. FACTORES REUMATOIDES**

Hagamos un poco de historia. En 1940 Waaler observó en el suero de los enfermos con artritis reumatoide la presencia de un factor que producía la aglutinación de los hematíes de carnero recubiertos con IgG de conejo<sup>90</sup>. Este hallazgo pasó desapercibido hasta que fue de nuevo descubierto por Rose y colaboradores ocho años más tarde<sup>91</sup>. En 1949, este factor recibió el nombre de factor reumatoide (FR), empleándose el término factor al no poder relacionarse con ningún estímulo antigénico conocido<sup>92</sup>, hasta que en 1957 se definió como un anticuerpo<sup>93</sup>.

#### 2.13.2.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA

Los factores reumatoides (FRs) son autoanticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos del fragmento Fc de las inmunoglobulinas IgG<sup>94</sup>. Estos autoanticuerpos, que pueden ser monoclonales o policlonales, son mayoritariamente de la clase IgM, aunque también se han observado FRs de las clases IgG, IgA e IgE.

#### 2.13.2.2. PATOGENIA Y POSIBLE FUNCIÓN FISIOLÓGICA

Se ha observado la presencia de FR, tanto en personas sanas, como en diferentes enfermedades. Las principales enfermedades que presentan concentraciones elevadas de FR son la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren. El punto en común de todas las enfermedades con factor reumatoide elevado parece ser una estimulación antigénica crónica. Las especulaciones con relación a la causa de la producción del factor reumatoide incluyen la activación policlonal de los linfocitos B por un antígeno y una disfunción de la regulación de los linfocitos T conducente a la producción del FR por dichos linfocitos B activados.

Los FRs tienen una función fisiológica en el incremento de la avididad de la IgG y en la captura, procesado y presentación a los linfocitos T de los antígenos atrapados en inmunocomplejos<sup>95</sup>.

Las personas sanas y los pacientes con artritis reumatoide comparten el conjunto de linfocitos B que segregan FR cuando se activan en presencia de linfocitos Th<sup>96, 97</sup>, estos linfocitos B son frecuentes y obviamente anérgicos en las personas sanas.

#### 2.13.2.3. MÉTODOS DE MEDIDA

La determinación del FR se ha realizado tradicionalmente con la prueba de Waaler-Rose de aglutinación con hematíes de carnero y con una prueba de aglutinación con partículas de látex recubiertas con IgG humana<sup>98</sup>. Ambas técnicas miden principalmente FR de tipo IgM, dándose los resultados en forma de título y considerando normalmente positiva una aglutinación del suero diluido superior a 1:80.

Posteriormente, se fueron describiendo técnicas de radioinmunoanálisis<sup>99</sup>, enzimoimmunoanálisis<sup>100, 101</sup>, nefelometría<sup>102</sup> y turbidimetría<sup>103</sup>. Actualmente las más utilizadas son estas dos últimas que se suelen emplear para determinar exclusivamente FR del tipo IgM. Se basan en el uso de partículas de látex recubiertas con IgG o en la precipitación de agregados solubles humanos de IgG<sup>104</sup>.

Los equipos comerciales para nefelometría o turbidimetría están estandarizados, principalmente desde la utilización de estándares de calibración basados en preparaciones de referencia internacionales que expresan los valores en UI/ml, lo que permite una mejora de la reproducibilidad y transferibilidad de los resultados.

#### 2.13.2.4. UTILIDAD CLÍNICA

Los factores reumatoides se encuentran presentes en el 70-90% de los pacientes con artritis reumatoide, en donde aproximadamente un 80% manifiestan FR de clase IgM<sup>105</sup>, sólo un 15% los presentan de la clase IgG y valores menores aún de las clases IgA o IgE. Aunque hay pruebas de que los diferentes isotipos de FR pueden ser importantes en la patogénesis de determinadas características de la artritis reumatoide<sup>106</sup>, en el momento actual no poseen un valor clínico reconocido.

Un FR elevado es uno de los criterios de valoración para la clasificación de artritis reumatoide del Colegio Americano de Reumatología<sup>107</sup>. Sin embargo, un FR positivo o negativo, ni la confirma ni la desmiente, aunque subclasifica a los pacientes en seropositivos o seronegativos. En la población general,

donde la prevalencia de artritis reumatoide es baja, un FR positivo posee un valor predictivo positivo bajo (20-30%) y no debe utilizarse en asistencia primaria, aislado, como una prueba de rastreo de la misma<sup>108</sup>. Sin embargo, en una población seleccionada con una alta prevalencia, la prueba puede ser muy útil<sup>109</sup>. Se sabe que una concentración alta de FR tipo IgM y/o IgG puede preceder al desarrollo de la enfermedad, por lo que se considera un factor de riesgo para la misma. Además, la utilidad del FR en los pacientes que se sabe tienen artritis reumatoide es principalmente pronóstica y de respuesta al tratamiento<sup>110</sup>. Una artritis reumatoide con FR elevado es indicativo de mal pronóstico y una concentración muy alta se correlaciona con una enfermedad más severa y una peor evolución<sup>111, 112</sup>. Los aumentos al inicio de la enfermedad favorecen, desde el punto de vista estadístico, el desarrollo de la cronicidad.

Los factores reumatoides no son específicos de la artritis reumatoide, apareciendo altos en otras enfermedades reumáticas<sup>108</sup> (Tabla 2-5). En el síndrome de Sjögren aparece elevado, incluso en ausencia de artritis reumatoide, o no asociado con enfermedad conectiva. En el LES la aparición de FR es un fenómeno intermitente y se manifiesta a concentraciones bajas. En la esclerosis sistémica su elevación presenta una buena correlación con la existencia de enfermedad articular.

**Tabla 2-5.**  
Presencia de factor reumatoide en las enfermedades reumáticas.

<b>Enfermedad</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Artritis reumatoide	50-90
LES	15-35
Síndrome de Sjögren	75-95
Esclerosis sistémica	20-30
Polimiositis/Dermatomiositis	5-10
EMTC	50-60

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

También, se han observado FR elevados en enfermedades no reumáticas<sup>108, 113</sup>, como en las infecciones con procesos inflamatorios crónicos (endocarditis bacterianas, leishmaniosis, lepra, TBC pulmonar, sífilis e infecciones víricas), las enfermedades pulmonares (sarcoidosis, fibrosis pulmonar intersticial, silicosis, asbestosis), las enfermedades hepáticas (hepatitis víricas agudas, cirrosis biliar

primaria), los síndromes linfoproliferativos y las neoplasias (Tabla 2-6). Normalmente, hasta un 5% de la población normal puede tener un factor reumatoide aumentado<sup>114</sup>.

**Tabla 2-6.**  
Factor reumatoide elevado en enfermedades no reumáticas.

<b>Enfermedad</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Edad superior a los 70 años	10-25
Infecciones	
• Endocarditis bacteriana	25-50
• Hepáticas	15-40
• Tuberculosis	8
• Sífilis	13
• Parásitos	20-90
• Lepra	5-60
• Víricas	15-65
Enfermedades pulmonares	
• Sarcoidosis	3-33
• Fibrosis pulmonar intersticial	10-50
• Silicosis	30-50
• Asbestosis	30
Otras	
• Cirrosis biliar primaria	47-70
• Cáncer	5-25

Extraído de “Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos”, Buitrago JM, 2000.

### **2.13.3. ANTICUERPOS CONTRA LOS FOSFOLÍPIDOS**

Los estudios de los anticuerpos contra los fosfolípidos se remontan a comienzos del siglo XX con el desarrollo de una prueba serológica contra la sífilis<sup>115</sup>. En 1942, Mary Pangborn identificó el componente antigénico de los extractos tisulares empleados en estas pruebas como un nuevo fosfolípido aniónico que llamó cardiolipina<sup>116</sup>. Durante la década de 1950 se observó que muchos enfermos con procesos autoinmunes presentaban resultados falsos positivos en las pruebas serológicas para la sífilis<sup>117</sup>. La



descripción del síndrome antifosfolípido por Hughes en 1983<sup>118</sup> y el desarrollo, primero de un radioinmunoanálisis<sup>119</sup> y, posteriormente de un enzoinmunoanálisis<sup>120</sup>, para la medida de anticuerpos contra la cardiolipina centró la atención de estos anticuerpos en la aparente especificidad fosfolípida. Sin embargo, en 1990 se señaló que estos anticuerpos van dirigidos contra un antígeno complejo que incluye la  $\beta$ 2-glucoproteína I ( $\beta$ 2-GPI)<sup>121, 122</sup>.

#### 2.13.3.1. ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA

Los anticuerpos contra los fosfolípidos son una población heterogénea de inmunoglobulinas que inicialmente se supuso estaban dirigidos contra estructuras fosfolípicas de carga negativa<sup>123</sup>, y que actualmente se sabe van dirigidos contra complejos de fosfolípidos y proteínas<sup>124</sup>.

#### 2.13.3.2. ANTICUERPOS CONTRA LA CARDIOLIPINA

Como se ha señalado anteriormente, en 1990 se indicó que los anticuerpos contra la cardiolipina no se unen a ella en ausencia de suero o plasma<sup>121, 122</sup>. El componente necesario del plasma se comprobó que es la  $\beta$ 2-GPI. No se conoce la función fisiológica de esta proteína aunque, estructuralmente, sea de la familia de proteínas de control del complemento.

La mayoría, si no todos, de los anticuerpos contra la cardiolipina asociados con el síndrome antifosfolípido están dirigidos contra epítomos que se expresan en la  $\beta$ 2-GPI y no en la cardiolipina. Inicialmente no estaba claro si se unían a la  $\beta$ 2-GPI en ausencia de fosfolípidos. En la actualidad, y desde hace ya varios años, las pruebas obtenidas indican sin lugar a dudas que sí se unen a la proteína sola<sup>125</sup>.

Además de los anticuerpos contra la  $\beta$ 2-GPI, las pruebas convencionales contra la cardiolipina detectan auténticos anticuerpos contra ella, esto es, anticuerpos que se unen a la cardiolipina en ausencia de proteínas séricas. Estos anticuerpos contra la cardiolipina se asocian con sífilis y otras enfermedades infecciosas y pueden aparecer en personas aparentemente sanas. No parecen encontrarse relacionados con las manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido.

### 2.13.3.3. SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

El término síndrome anticardiolipina fue utilizado por vez primera por Hughes en 1986 para describir a las pacientes que presentaban trombosis venosa y arterial, trombocitopenia y pérdida recurrente de fetos, junto con concentraciones séricas elevadas de anticuerpos contra la cardiolipina<sup>126</sup>. En la actualidad recibe el nombre de síndrome antifosfolípido. El síndrome puede ser primario o secundario<sup>127</sup>. El primario es aquel con características clínicas y sin pruebas de otra enfermedad autoinmune, mientras que el secundario lo es a otras enfermedades como el LES.

En la Tabla 2-7 se presentan las principales manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido.

**Tabla 2-7.**  
Principales manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido.

---

<b>Vasculares:</b>	Trombosis venosa y arterial.
<b>Neurológicas:</b>	Ictus, neuropatía periférica, corea, ataque isquémicos transitorios.
<b>Obstétricas:</b>	Abortos espontáneos recurrentes, retraso del crecimiento fetal, muerte fetal intrauterina.
<b>Dermatológicas:</b>	Livedo reticularis, necrosis cutánea.
<b>Hematológicas:</b>	Trombocitopenia, déficit de protrombina.

---

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

### 2.13.3.4. PATOGENIA

No se dispone de muchos datos sobre la respuesta inmunitaria que conduce a la producción de autoanticuerpos asociados con el síndrome antifosfolípido, aunque los linfocitos T si parecen desempeñar un papel importante en su producción y en la patogenia de la enfermedad. En la actualidad se sabe con certeza que los autoanticuerpos no solo son marcadores de la enfermedad, sino que también contribuyen de forma directa al desarrollo de las tres manifestaciones clínicas cardinales<sup>128</sup>: las trombosis, las pérdidas fetales y la trombocitopenia.

#### MECANISMOS DE TROMBOSIS.

Los principales mecanismos propuestos para la trombosis mediada por los anticuerpos contra los fosfolípidos son la inhibición de las reacciones de anticoagulación, la inhibición de la fibrinólisis y acontecimientos mediados por células como, v.g., la activación/agregación de las plaquetas.

#### MECANISMOS DE LAS PÉRDIDAS FETALES.

Se supone que la pérdida fetal es un caso especial de trombosis que afecta a la placenta<sup>129</sup>.

#### MECANISMOS DE LA TROMBOCITOPENIA.

La trombocitopenia asociada se supone se debe a autoanticuerpos contra las plaquetas.

#### 2.13.3.5. MÉTODOS DE MEDIDA.

En 1983 Harris y colaboradores describieron la detección de anticuerpos contra la cardiolipina por medio de radioinmunoanálisis<sup>119</sup>. Posteriormente, se han presentado inmunoanálisis no isotópicos más adecuados para los laboratorios clínicos<sup>120</sup>. Todos los enzimoimmunoanálisis utilizados para la determinación de anticuerpos antifosfolípidos son del tipo ELISA y utilizan como antígeno para recubrir las placas cardiolipina purificada o una mezcla de fosfolípidos cargados negativamente. Dichos anticuerpos presentes en el suero o plasma reaccionan y se unen al antígeno que recubre en los pocillos. La cantidad de anticuerpo unido se mide utilizando anticuerpos humanos del isotipo adecuado conjugados con enzimas. La cantidad e anticuerpos antifosfolípidos se mide por la intensidad del color producido cuando se añade un sustrato cromogénico.

La mayoría de los laboratorios clínicos realizan pruebas para al detección de los anticuerpos anticardiolipina de los isotipos IgG e IgM. Las concentraciones séricas elevadas de los IgG presentan una mayor prevalencia y parecen ser más relevantes desde el punto de vista clínico que los IgM<sup>130</sup> para predecir la existencia de trombosis, trombocitopenia y aborto recurrente. Posteriormente, se ha observado que las concentraciones séricas elevadas de IgA se correlacionan mejor con la morbilidad gestacional que los IgG o los IgM<sup>131</sup>. No obstante, cabe destacar que el mero hallazgo de anticuerpos contra la cardiolipina en ausencia de sintomatología clínica relevante no es una indicación para el tratamiento<sup>132</sup>.

Los ELISA convencionales para los anticuerpos contra la cardiolipina detectan también anticuerpos contra la  $\beta$ 2-GPI<sup>133</sup>. De todas maneras se desarrollaron, además, enzimoimmunoanálisis que utilizan como antígeno  $\beta$ 2-GPI humana sin fosfolípidos<sup>134</sup>, presentando la comparación de las pruebas anticardiolipina con estos ELISAs una buena correlación en el síndrome antifosfolípido.

### 2.13.3.6. SIGNIFICADO CLÍNICO.

Se ha observado la presencia de anticuerpos contra los fosfolípidos en diversos procesos, como las enfermedades autoinmunitarias, las infecciones, la toma de determinados medicamentos, en algunos cánceres y en el síndrome antifosfolípido primario (Tabla 2-8). Cabe destacar que el LES es la enfermedad autoinmune en que más se ha estudiado la presencia de estos anticuerpos<sup>135</sup>, y que dentro de las enfermedades infecciosas destaca su presencia en el SIDA<sup>136</sup>, tratándose en este síndrome de verdaderos anticuerpos dirigidos contra la cardiolipina y no contra la  $\beta$ 2-GPI.

**Tabla 2-8.**

Procesos en los que se han detectado anticuerpos contra los fosfolípidos.

---

**Enfermedades autoinmunitarias**

- LES
- Artritis reumatoide
- Esclerosis sistémica progresiva
- Dermatomiositis/Polimiositis
- Enfermedad mixta del tejido conjuntivo

**Exposición a fármacos**

- Clorpromacina
- Procaïn amida
- Hidralazina
- Quinidina
- Antibióticos
- Fenitoína

**Infecciones**

- Bacterianas
- Víricas
- Por protozoos

**Enfermedades linfoproliferativas**

- Leucemia de células peludas
- Linfomas malignos
- Macroglobulinemia de Waldenström

**Otros procesos diversos**


---

Extraído de "Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos", Buitrago JM, 2000.

### **3. PRÓTESIS MAMARIAS DE SILICONA**

#### **3.1. TIPOS DE IMPLANTES MAMARIOS DE SILICONA<sup>137, 138</sup>**

Los tipos actuales de implantes mamarios se pueden agrupar según las características de la superficie de los mismos.

##### **3.1.1. IMPLANTES DE SUPERFICIE LISA**

Implante mamario liso relleno de gel de silicona con cápsula de barrera de alto rendimiento.

Presenta una cubierta de barrera formada por un elastómero de silicona de alto rendimiento y baja permeabilidad (Medical Service®).

##### **3.1.2. IMPLANTES DE SUPERFICIE TEXTURADA**

###### 3.1.2.1. IMPLANTE MAMARIO TEXTURADO CON CÁPSULA DE BARRERA DE ALTO RENDIMIENTO RELLENO DE GEL DE SILICONA.

Presenta una cápsula formada por un elastómero de silicona de alto rendimiento que posee una superficie texturada integral de alto rendimiento con unos diámetros de poro que oscilan entre 300-800 micrones (Medical Service®).

###### 3.1.2.2. IMPLANTE MAMARIO TEXTURADO DE SILICONA RELLENO DE SUERO SALINO CON VÁLVULA DE DIAFRAGMA ANTERIOR.

Presenta una cubierta formada por un elastómero de silicona de extra alto rendimiento (EHP) con una válvula de diafragma anterior para facilitar el llenado y la aspiración de aire residual (Medical Service®).

### 3.1.2.3. IMPLANTE MAMARIO TEXTURADO RELLENO DE PVP (POLIVINILPIRROLIDONA)-HIDROGEL.

Implante de un solo lumen compuesto por una cápsula de silicona con una textura rugosa osmóticamente equilibrada, y un material de relleno biocompatible, denominado PVP-Hidrogel con alta radiolucencia (mayor que en los rellenos de gel de silicona o de suero salino) que permite una mejor visualización del tejido durante las mamografías y la visión de las estructuras detrás del implante. Este hidrogel es soluble en agua y es excretado por los riñones en caso de ruptura sin ser metabolizado en el cuerpo (Medical Service®).

### 3.1.2.4. IMPLANTE MAMARIO TEXTURADO MONOBLOC® PRE-RELLENO DE CARBOXI-METILCELULOSA-HIDROGEL.

Presenta una cubierta formada por un elastómero de silicona.

La soldadura de las cubiertas es autógena con fabricación en Monobloc®, en la que se realiza la vulcanización del disco de oclusión en el mismo tiempo que el pegado; esto provoca un reparto homogéneo de las fuerzas sobre los discos de oclusión.

El hidrogel de relleno presenta las siguientes características:

- Gel de carboxi-metilcelulosa al 3.70% con agua farmacéutica de Aguettant.
- Biocompatibilidad, fisiológicamente inerte, estable en el tiempo y biodegradable en agua y CO<sub>2</sub> a las dosis y bajo las condiciones utilizadas.
- No altera las cubiertas de los implantes (no hay filtración ni imbibición de ellas).
- Radiotransparente. (Arion Laboratories®).

No obstante, y sin importar el tipo de superficie de la prótesis, surge un modelo de inflamación crónica proliferativa que se puede identificar en las capsulectomías periprotésicas comenzando por una metaplasia sinovial con proliferación de células mesenquimales CD-68 negativas y anticuerpos anti-vimentin positivos en el área periférica al implante y que terminan por transformarse en una etapa posterior en tejido colágeno fibroso hialino denso tras un período tardío de la implantación (> 2 años). Por

esto, la textura de la superficie de la prótesis modifica solamente el curso, pero no la calidad de la inflamación crónica fibrosa<sup>139</sup>. El sangrado derivado del implante de la prótesis así como la incorporación de una capa de espuma de poliuretano en la cápsula periprotésica de la mama en los diversos tipos de prótesis conduce a una infiltración linfoplasmocitaria significativa, definido como "vasculitis de la silicona".

Los signos morfológicos de una inmunorespuesta, al menos local, son perceptibles en 8,3% de las cápsulas fibróticas examinadas incluso sin cuerpo extraño morfológicamente identificable. Pueden ser debidos posiblemente tanto a la ausencia completa de tejido colágeno hialino fibroso en un 30% de los casos, como a la diversa susceptibilidad, de causa no clarificada, inter-individual de las portadoras del implante. Solamente el registro sistemático de los patrones de reacción morfológicos anteriormente indicados en una prótesis junto con la observación clínica adicional de los pacientes puede asegurar en un futuro la valoración realista de los riesgos de salud potenciales causados por los implantes mamarios de silicona.

## 4. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL TRABAJO

El implante quirúrgico de prótesis mamarias con cápsula periprotésica de silicona, en cirugía reconstructiva o por motivos estéticos, viene realizándose desde hace más de cinco décadas<sup>140, 141</sup>. Pese a ser considerados seguros, en algunas pacientes sometidas a estos implantes, sin embargo, se ha descrito un grupo de síntomas similares a los observados en enfermedades del tejido conectivo como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o polimiositis. Hasta la fecha, las secuelas inmunológicas no se han confirmado y sigue siendo causa de polémica<sup>142, 143</sup>. Algunos autores han sugerido que no se puede establecer una relación entre esta posible reacción inmune a los implantes y una frecuencia creciente de alteraciones reumáticas<sup>144</sup>.

El implante de silicona puede causar complicaciones locales<sup>145, 146</sup> tales como contracción capsular, ruptura, capsulotomía cerrada, "corrimiento" del gel, granulomas a cuerpo extraño en el tejido capsular y nódulos linfáticos, o incluso síntomas generales. Una reacción inmune adversa con signos y síntomas de enfermedades reumáticas es también posible, aunque un incremento de la frecuencia de enfermedades autoinmunes sistémicas verdaderas es discutible. Tal fue la polémica que en el año 2003 la Federación de Alimentos y Drogas de los EE.UU. aconsejó que los implantes de silicona fueran utilizados solamente en cirugía reconstructiva y como parte de ensayos clínicos<sup>147</sup>. La silicona no es una sustancia inerte y los compuestos de la misma se pueden encontrar en la sangre y en el hígado de mujeres con implante mamario de silicona. El desarrollo de enfermedad relacionada con los implantes de silicona dependería de factores genéticos, de modo que muy pocas mujeres tendrían un riesgo potencial.

En estudios se comprobó que los implantes rellenos de suero salino proporcionan una alternativa segura y eficaz, a los de gel de silicona<sup>148</sup>. Pese a todo, las posibles alteraciones inmunológicas dependerían de la superficie de contacto, la envoltura de la prótesis, que es similar en todos los tipos<sup>149</sup>.

Los patrones morfológicos de reacción local en el implante de mama pueden ser un punto de partida importante<sup>139</sup>, así como la controvertida inmunorespuesta sistémica ocasionada por la silicona<sup>142, 143, 144</sup>.



En medio de esta polémica, algunos autores no encuentran ninguna frecuencia aumentada de anomalías inmunológicas en las mujeres expuestas al implante mamario de silicona, a excepción de la positividad de los autoanticuerpos anti-ssDNA, no habiéndose valorado todavía su importancia clínica<sup>150</sup>. No obstante en estudios posteriores en modelos animales si que se ha comprobado una clara relación entre la exposición a la silicona y un aumento de la producción de anticuerpos antinucleares (ANA)<sup>151</sup>.

Hasta tal punto llega la controversia que en 2011 se describió un nuevo síndrome llamado "ASIA" (*Autoimmune/Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants*) que fue definido para resumir por primera vez el espectro de enfermedades inmunomediadas provocadas por un estímulo adyuvante como la exposición crónica a silicona, tetramethylpentadecano, pristano, aluminio y otros adyuvantes<sup>152</sup>. Pese a todo la causalidad es difícil de probar porque ASIA sólo se produce en una pequeña fracción de pacientes expuestos a estos adyuvantes<sup>153</sup>. Posteriormente fue relacionado con los implantes mamarios de silicona<sup>143</sup>.

## 5. OBJETIVOS

Por todo lo expuesto en el apartado anterior nos hemos planteado como hipótesis de trabajo la existencia de alteraciones inmunitarias en general, y de una respuesta autoinmune en particular, en mujeres relacionadas con los implantes mamarios con cápsula periprotésica de silicona.

Nuestro objetivo primordial será, por tanto, aceptar o rechazar dicha hipótesis comprobando las posibles alteraciones inmunitarias y la existencia o no de una respuesta autoinmune asociadas a la implantación quirúrgica de prótesis mamarias.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



# 1. SELECCIÓN DE PACIENTES

## 1.1. TIPO DE DISEÑO DEL ESTUDIO

Se plantean dos estudios paralelos.

- A) Estudio longitudinal prospectivo, en mujeres que van a realizarse un implante de prótesis mamarias.
- B) Estudio de cohortes retrospectivo, en mujeres en las que dicho implante fue realizado entre 3 y 5 años atrás.

Todas las pacientes fueron reclutadas para ambos estudios entre los meses de enero de 2000 y junio de 2005, ambos inclusive.

## 1.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

### 1.2.1. ESTUDIO A

Mujeres no menopáusicas, entre 18 y 45 años, sin patología neoplásica ni autoinmunitaria previa, que por motivos de estética vayan a someterse a un implante quirúrgico mamario con cápsula periprotésica de silicona.

### 1.2.2. ESTUDIO B

COHORTE EXPUESTA.

Mujeres no menopáusicas, entre 18 y 45 años, sin patología neoplásica ni autoinmunitaria previa, que, por motivos de estética, entre 3 y 5 años atrás se les realizó un implante quirúrgico mamario de silicona.

COHORTE NO EXPUESTA.

Mujeres sanas no menopáusicas, sin tipo alguno de cirugía estética, dentro del mismo rango de edad que las pacientes sometidas al estudio.

### **1.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

#### **1.3.1. ESTUDIO A**

Se excluyeron del estudio a aquellas mujeres que presentaban cualquier patología infecciosa, inmunitaria o inflamatoria activa.

#### **1.3.2. ESTUDIO B**

Se aplicaron criterios similares a los del estudio A.

## **2. METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS**

### **2.1. ESTUDIO PROSPECTIVO**

Se realiza una revisión y análisis de los datos clínicos y semiológicos correspondientes a las historias clínicas de las pacientes objeto del estudio, prestando especial atención a los siguientes datos, tanto demográficos como clínicos: edad, lugar de residencia (rural o urbana), profesión, estado civil, peso, enfermedades actuales o pasadas y tratamientos que pueda llevar, antecedentes de enfermedades reumáticas, número de embarazos e hijos, intervenciones quirúrgicas estéticas o generales, toma de anticonceptivos, hábito tabáquico, alergias medicamentosas, si lleva tatuajes o *peersings* y, por último, las posibles complicaciones postoperatorias derivadas de los implantes.

Se extrae una muestra sanguínea prequirúrgica y otra postquirúrgica a los 12 meses de la intervención.

### **2.2. ESTUDIO RETROSPECTIVO**

Al igual que en el prospectivo se revisan las historias clínicas de la cohorte expuesta y, además, se cumplimenta una historia clínica y encuesta epidemiológica de la no expuesta. Todo ello haciendo especial énfasis en los aspectos anteriormente citados.

En este estudio se realiza una toma sanguínea única en ambos grupos. No obstante, las determinaciones analíticas van a ser las mismas en ambos estudios.

### **2.3. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS**

Se obtiene la sangre por venopunción en la flexura del codo, mediante un sistema de extracción sanguínea con campana de vacío, recogándose cada espécimen en los tubos correspondientes según cual

vaya a ser su utilización (dos tubos de 5 ml con gel separador para los especímenes de bioquímica y dos tubos de 5 ml con anticoagulante EDTA tripotásico para el hemograma y las poblaciones linfocitarias).

Los especímenes para el hemograma y las poblaciones linfocitarias se procesan sin preparación previa dentro de las 4 horas siguientes como máximo.

Los especímenes para bioquímica se dejan coagular a temperatura ambiente durante un período de tiempo no superior a una hora y a continuación se centrifugan a 2000 G durante 20 minutos. Tras la centrifugación se procede a la separación y alicuotación del sobrenadante (suero), almacenándose a 4° C hasta el momento en que se realizan las determinaciones siempre que se vayan a efectuar antes de transcurridas 24 horas. Si dichas determinaciones no se pueden realizar en este tiempo, las alícuotas se conservarán congeladas a -20° C hasta su análisis.



### 3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

#### 3.1. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS GENERALES

Se determina un hemograma completo con poblaciones leucocitarias por medio de un sistema hematológico automatizado (*ADVIA 120®*, *Bayer®*). En el estudio prospectivo, se tiene en cuenta el hemograma sólo previamente a la intervención quirúrgica.

Los valores normales del hemograma en adultos son:  $4.8-10.8 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu\text{l}$ ,  $4.2-6.1 \times 10^6$  hematíes/ $\mu\text{l}$ , 12-16 g de hemoglobina/dl, 30-45% de hematocrito, volumen corpuscular medio de 80-99 fl y  $130-400 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{l}$ .

La distribución normal de las poblaciones leucocitarias en el adulto es: 35-80% de neutrófilos segmentados, 17-45% de linfocitos, 2.5-8.5 % de monocitos, 0.5-4.5% de eosinófilos, 0-1% de basófilos y 0.4-3.9% de células grandes anormales.

La calibración y el control de calidad se realizan por medio del calibrador *ADVIA 120® SETpoint™*.

Los valores específicos del sistema indicados para dicha calibración se han obtenido de análisis repetidos del calibrador, estableciéndose dichos valores utilizando métodos de referencia.

#### 3.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS GENERALES

Se determinan la albúmina y las proteínas totales (en el estudio prospectivo solo prequirúrgicamente) y la proteína C reactiva (PCR<sup>152</sup>). Todas las determinaciones se realizaron en autoanalizadores de química clínica (*AU 5400®*, *Olympus®*).

##### 3.2.1. PROTEÍNAS TOTALES

Prueba colorimétrica por el método de Biuret con reactivos de *Olympus® System Reagent*.

Los valores normales en adultos son de 6.3 a 8.5 g/dl.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un coeficiente de variación (CV) de 0.51% - 1.24%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.29% - 1.59%.

### **3.2.2. ALBÚMINA**

Prueba colorimétrica por el método VBC (verde de bromocresol) con reactivos de *Olympus® System Reagent*.

Los valores normales en adultos son de 3.5 a 5 g/dl.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 0.92% - 1.80%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.79% - 2.62%.

### **3.2.3. PROTEÍNA C REACTIVA (PCR)**

Prueba inmunoturbidimétrica por el método *fixed-time* con reactivos de *Olympus® System Reagent*.

Los valores normales en adultos son de 0 a 5 mg/l.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 1.02% - 2.81%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.29% - 5.99%.

## **3.3. PARÁMETROS HUMORALES INMUNOLÓGICOS**

Se determinan las Ig<sup>1-4</sup> A, G y M y los factores C3 y C4 del sistema del complemento<sup>1-4</sup>.

Todas las determinaciones se realizaron en autoanalizadores de química clínica (*AU 5400®, Olympus®*).

### **3.3.1. INMUNOGLOBULINA A (IgA)**

Prueba inmunoturbidimétrica por el método de punto final con reactivos de *Olympus® System*

*Reagent.*

Los valores normales en adultos son de 70 a 400 mg/dl.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 0.63% - 1.16%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.08% - 1.81%.

### **3.3.2. INMUNOGLOBULINA G (IgG)**

Prueba inmunturbidimétrica por el método de punto final con reactivos de *Olympus® System*

*Reagent.*

Los valores normales en adultos son de 700 a 1200 mg/dl.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 0.49% - 2.07%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.16% - 2.88%.

### **3.3.3. INMUNOGLOBULINA M (IgM)**

Prueba inmunturbidimétrica por el método de punto final con reactivos de *Olympus® System*

*Reagent.*

Los valores normales en adultos son de 40 a 230 mg/dl.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 0.72% - 1.30%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.35% - 2.16%.

### **3.3.4. FACTOR DEL COMPLEMENTO 3 (C3)**

Prueba inmunturbidimétrica por el método de punto final con reactivos de *Olympus® System*

*Reagent.*

Los valores normales en adultos son de 90 a 180 mg/dl.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 0.64% - 1.24%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.01% - 1.38%.

### **3.3.5. FACTOR DEL COMPLEMENTO 4 (C4)**

Prueba inmunoturbidimétrica por el método de punto final con reactivos de *Olympus® System Reagent*.

Los valores normales en adultos son de 10 a 40 mg/dl.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 0.84% - 2.31%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.19% - 2.48%.

## **3.4. ANTICUERPOS SÉRICOS**

### **3.4.1. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA)**

Los ANA se determinan en un primer momento mediante enzoinmunoanálisis en fase sólida (*ETI-ANA Screen, DiaSorin®*). Este análisis detecta colectivamente, en un pocillo, los ANA totales contra ADN bicatenario o nativo (dsDNA o nDNA), histonas, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 y antígenos centroméricos. Los positivos, posteriormente, se confirman por IFI con Hep-2 a una dilución del 1/40.

Los resultados se expresan cualitativamente como positivo o negativo.

La sensibilidad de la prueba es del 100% para sueros positivos y la especificidad del 92.8%.

La repetibilidad (variaciones dentro de la serie) presenta un CV de 6,6% - 9,5%.

La reproducibilidad (variaciones entre series) presenta un CV de 6,8% - 8,3%.

### **3.4.2. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS**

Estos anticuerpos sólo se determinarán en aquellas mujeres cuyos resultados de los ANA sean positivos, a excepción de los anti-ssDNA que, debido a su falta de inclusión en el cribaje de ANA, sí que se realizarán a todas las participantes.

#### 3.4.2.1. ANTICUERPOS ANTI-DNA (dsDNA Y ssDNA)

Los anticuerpos anti-DNA, tanto de simple como de doble cadena, se determinan mediante enzimoimmunoanálisis en fase sólida (*ETI-dsDNA Screen* y *ETI-ssDNA Screen, DiaSorin®*).

Los resultados se expresan cualitativamente como positivo (dsDNA > 28 UI/ml, ssDNA > 21 UI/ml) o negativo (dsDNA ≤ 28 UI/ml, ssDNA ≤ 21 UI/ml).

Para dsDNA la sensibilidad es del 90% y la especificidad del 97.2%.

Para ssDNA la sensibilidad es del 100% y la especificidad del 97.3%.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta unos CV ≤ 4.7% para dsDNA y ≤ 7.7% para ssDNA.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta unos CV ≤ 8.3% para dsDNA y ≤ 14% para ssDNA.

#### 3.4.2.2. OTROS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

La determinación del resto de los anticuerpos específicos (anti-SSA/Ro 52 y 60, anti-SSB/La, anti-histonas, anti-Sm B y D, anti-RNP A, C y 70, anti-centrómeroB, anti-Scl-70/TopoI, anti-Jo-I y anti-ribosomal P) se realiza mediante un enzimoimmunoanálisis en bandas sobre membrana de nylon con una base de tira de plástico (*INNO-LIA® ANA Update*).

Los resultados se expresan cualitativamente como positivo o negativo, según reaccionen unas bandas u otras sobre la tira de plástico.

La sensibilidad de la prueba varía entre el 44 y 84% según tipo de anticuerpo y patología.

La especificidad de la prueba varía, de igual manera, entre el 98.2 y el 100%.

El suero control *cut-off*, que debe ser incluido en cada ensayo, ha sido seleccionado por su contenido de diferentes niveles de anticuerpos. Su valor se ha determinado sobre la base de un análisis estadístico (ROC) con 436 sueros positivos y 305 negativos. Todas las bandas de esta tira *cut-off* deben ser visibles al final de la prueba.

### 3.5. ANTICUERPOS CONTRA PROTEÍNAS CIRCULANTES

#### 3.5.1. FACTOR REUMATOIDE (FR)

Prueba inmunoturbidimétrica con reactivos de *Olympus® System Reagent*. Todas las determinaciones se realizaron en autoanalizadores de química clínica (*AU 5400®, Olympus®*).

Los valores normales en adultos son de 0 a 40 UI/ml.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 1.69% - 5.90%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 1.99% - 9.92%.

Este método está comparado, además, con otro análisis de FR (mejorado con látex) comercializado habitualmente, utilizando muestras de suero de pacientes. El resultado del análisis de regresión lineal fue, con  $n=91$ , de  $r=0.963$ , con un intervalo de muestra de 3.48-181.44 UI/ml.

#### 3.5.2. ANTICUERPOS CONTRA LA CARDIOLIPINA

Los anticuerpos IgG, IgM e IgA contra la cardiolipina se determinan mediante enzimoimmunoanálisis, *INOVA QUANTA Lite™ ACA SCREEN (HRP)*.

Los resultados se expresan cualitativamente como positivo o negativo.

La sensibilidad de la prueba es del 96% y la especificidad del 94.9%.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 5.9% - 7.0%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 4.1% - 10.0%.

#### 3.5.3. ANTICUERPOS CONTRA LA $\beta$ 2-GLUCOPROTEÍNA I ( $\beta$ 2-GPI)

Los anticuerpos IgG contra la  $\beta$ 2-GPI se determinan mediante enzimoimmunoanálisis, *INOVA QUANTA Lite™  $\beta$ 2-GPI IgG*.

Los resultados se expresan cualitativamente como positivo o negativo.

Concordancia con los anticuerpos anticardiolipina: La sensibilidad y especificidad relativas son del 30 y del 100% respectivamente.

La repetibilidad (variaciones intraanálisis) presenta un CV de 3.2% - 5.3%.

La reproducibilidad (variaciones interanálisis) presenta un CV de 3.5% - 5.4%.

## 4. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS

Todos los datos fueron recogidos en los formularios de recogida de datos. Posteriormente se confeccionó una base de datos Excel 2013 donde se codificaron las variables a estudio facilitando el análisis estadístico como aplicación exportadora de los datos al paquete estadístico SPSS v23.

Los datos se presentaron utilizando estadísticos de tendencia central y de dispersión: media y desviación típica (DT). Los datos correspondientes a las variables cualitativas se expresan como valor absoluto de casos y en porcentaje (%).

Para el estudio de la normalidad de las distribuciones se utilizó el test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre los valores del análisis de las variables continuas se realizó mediante el test t de Student para datos independientes en caso de presentar normalidad. El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para comparar 3 o más medias. La prueba no paramétrica de Mann-Whitney se usó cuando se rechazó la hipótesis de normalidad en la comparación de dos muestras y el Test de Kruskal-Wallis en la comparación de tres o más. La relación entre las variables continuas se estableció mediante el coeficiente de correlación de Pearson y no paramétrico de Spearman.

Para todas las pruebas se aceptó un nivel de significación inferior a 0.05 en contraste bilateral. El análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS v23.0.



# **RESULTADOS**



## 1. ESTUDIO PROSPECTIVO

Tras la recogida de datos, un total de 500 mujeres fueron incluidas en el estudio. Se procesaron muestras sanguíneas de todas ellas, una prequirúrgica y otra postquirúrgica a los 12 meses de la intervención. Los resultados referidos a las características de dichas mujeres se detallan a continuación.

### 1.1. DESCRIPTIVOS

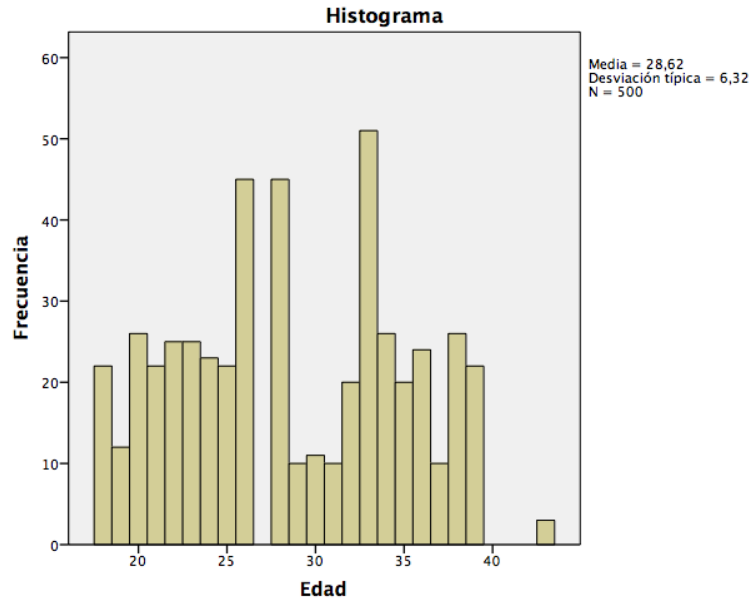
#### 1.1.1. ANÁLISIS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y SOCIODEMOGRÁFICAS

##### 1.1.1.1. EDAD, PESO

	n	Media	DT*	Vm*	VM*
Edad (años)	500	28,62	6,32	18	43
Peso (Kg)	500	56,45	6,51	42	69

\* DT: Desviación típica; Vm: valor mínimo; VM: Valor máximo

La edad media se sitúa en 28,62 años (D.T.=6,32) y la mitad de las mujeres tienen una edad inferior a 28 años. El valor máximo es de 43 años y el mínimo de 18. Los coeficientes de asimetría ( $z=0,43$ ) y de curtosis ( $z=5,26$ ) permiten afirmar que la distribución de la edad no se asemeja a la distribución normal, lo que queda corroborado con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. ( $p>0,05$ ), tal y como se puede comprobar en las siguientes figuras:

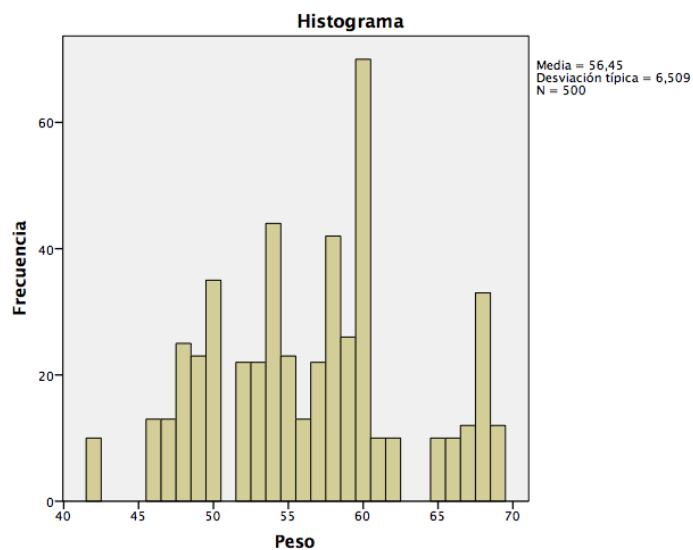


**Pruebas de normalidad**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Edad	,120	500	,000	,955	500	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

El peso medio se sitúa en 56,45 kg (D.T.=6,51) y la mitad de las mujeres tienen un peso inferior a 57 kg. El valor máximo es de 697 Kg y el mínimo de 42 kg. Al igual que en la variable anterior, tanto la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ) como el coeficiente de asimetría, ( $z = 1,1$ ) no nos permite aceptar que la variable peso siga una distribución gaussiana, como se puede comprobar en las siguientes figuras:



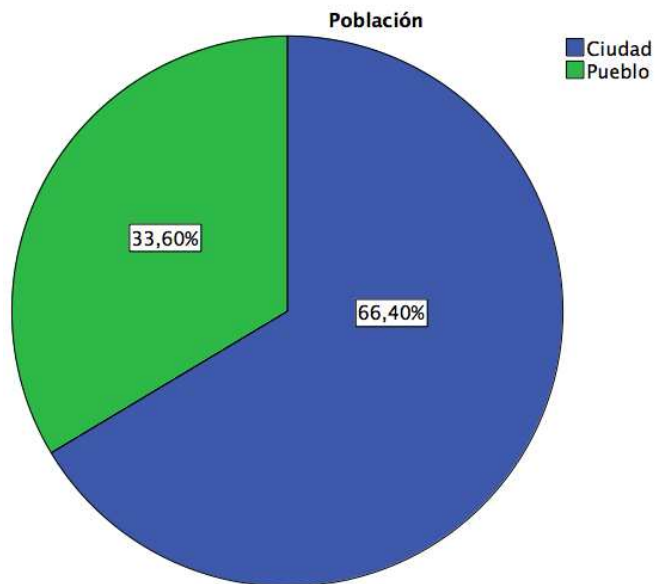
**Pruebas de normalidad**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Peso	,099	500	,000	,968	500	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

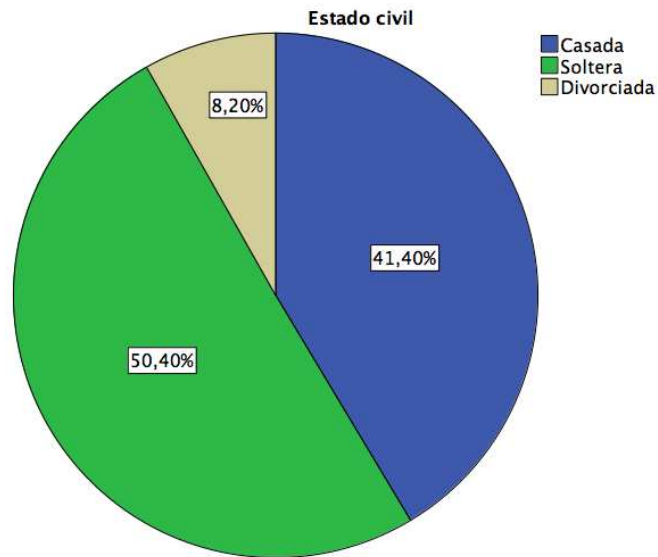
1.1.1.2. POBLACIÓN DE RESIDENCIA

Población	Frecuencia
Ciudad	332 (66,4%)
Pueblo	168 (33,6%)

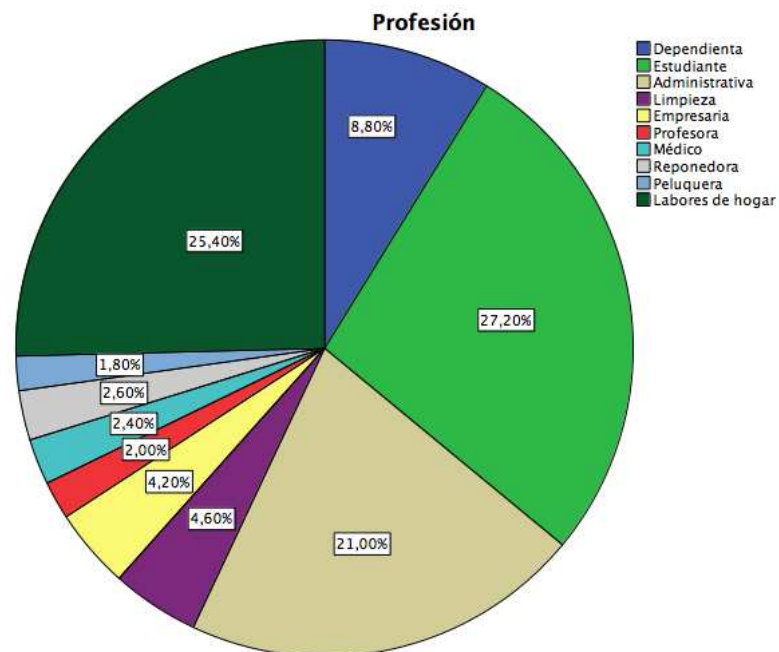


1.1.1.3. ESTADO CIVIL

Estado civil	Frecuencia
Soltera	252 (50,4%)
Casada	207 (41,4%)
Divorciada	41 (8,2%)

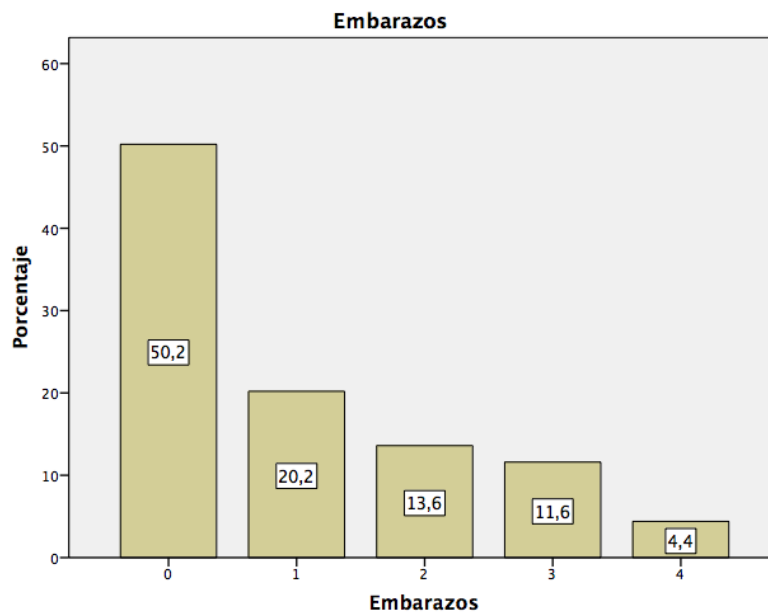


1.1.1.4. PROFESIÓN



Predominan claramente las mujeres estudiantes (27,2%), las que se dedican a labores del hogar (25,4%) y las administrativas (21%). Siguen las dependientas con un 8,8% y en menor medida, el resto de profesiones.

**1.1.1.5. EMBARAZOS**



Podemos comprobar claramente cómo a mayor número de embarazos, menos cantidad de mujeres se operan para implante de mama.

**1.1.2. ANÁLISIS VARIABLES ANALÍTICAS**

	n	media	DT*	SE*(z)
PCR (anterior)	500	1,10	0,519	
PCR (12 meses)	500	0,90	0,0295	<b>0,000</b>
IgA (anterior)	500	180,88	74,694	
IgA (12 meses)	500	189,23	74,301	<b>0,000</b>
IgG (anterior)	500	897,78	173,330	
IgG (12 meses)	500	906,21	171,711	<b>0,000</b>
IgM (anterior)	500	114,70	52,161	
IgM (12 meses)	500	118,47	50,163	<b>0,000</b>
C3 (anterior)	500	100,92	18,714	
C3 (12 meses)	500	107,45	17,449	<b>0,000</b>
C4 (anterior)	500	25,83	10,072	
C4 (12 meses)	500	26,06	6,757	<b>0,000</b>
Leucocitos (anterior)	500	6,607	1,8282	
Leucocitos (12 meses)	500	6,530	1,5095	0,539
Linfocitos (anterior)	500	2,234	0,7569	
Linfocitos (12 meses)	500	2,163	0,6646	<b>0,002</b>
Linfocitos% (anterior)	500	34,213	8,7216	
Linfocitos% (12 meses)	500	34,614	8,7699	0,097
FR (anterior)	500	21,25	7,068	
FR (12 meses)	500	23,67	6,987	<b>0,000</b>

**\*DT:**  
**desviación**  
**típica; SE:**  
**Significació**  
**n**  
**estadística**

En la tabla anterior se detallan los valores de las variables analizadas, tanto en la primera analítica como a los 12 meses de la intervención. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes análisis en todos los casos, excepto en Leucocitos y Linfocitos%. Observamos un descenso estadísticamente significativo de PCR y linfocitos a los 12 meses con respecto a la analítica inicial. De igual

modo, observamos incrementos estadísticamente significativos en IgA, IgG, IgM, C3, C4, y FR a los 12 meses con respecto a la analítica inicial.

### 1.1.3. ANÁLISIS VARIABLES ANALÍTICAS DEPENDIENTES DE LOS VALORES DE ANA (Negativo/positivo):

	ANA	N	Media	DT*	SE* (p)
FR (anterior)	Neg.	470	21,24	7,040	0,946
	Pos.	30	21,33	7,608	
FR (12 meses)	Neg.	470	23,67	6,945	0,961
	Pos.	30	23,73	7,732	
IgA (anterior)	Neg.	470	180,96	75,058	0,925
	Pos.	30	179,63	69,919	
IgA (12 meses)	Neg.	470	189,22	74,641	0,992
	Pos.	30	189,37	69,942	
IgG (anterior)	Neg.	470	897,18	172,853	0,759
	Pos.	30	907,20	183,436	
IgG (12 meses)	Neg.	470	905,46	171,293	0,698
	Pos.	30	918,03	180,730	
IgM (anterior)	Neg.	470	114,74	52,353	0,952
	Pos.	30	114,17	49,899	
IgM (12 meses)	Neg.	470	118,47	50,386	0,991
	Pos.	30	118,57	47,335	
C3 (anterior)	Neg.	470	100,94	18,665	0,938
	Pos.	30	100,67	19,786	
C3 (12 meses)	Neg.	470	107,29	17,418	0,410
	Pos.	30	110,00	18,021	
C4 (anterior)	Neg.	470	25,88	10,016	0,668
	Pos.	30	25,07	11,061	
C4 (12 meses)	Neg.	470	26,10	6,757	0,608
	Pos.	30	25,43	6,836	
Leucocitos (anterior)	Neg.	470	6,601	1,8299	0,805
	Pos.	30	6,687	1,8307	
Leucocitos (12 meses)	Neg.	470	6,530	1,5141	0,981
	Pos.	30	6,523	1,4604	
Linfocitos (anterior)	Neg.	470	2,233	,7514	0,829
	Pos.	30	2,263	,8524	
Linfocitos (12 meses)	Neg.	470	2,164	,6602	0,909
	Pos.	30	2,150	,7413	
Linfocitos% (anterior)	Neg.	470	34,238	8,7760	0,801
	Pos.	30	33,823	7,9461	
Linfocitos% (12 meses)	Neg.	470	34,631	8,8205	0,867
	Pos.	30	34,353	8,0669	

\*DT: desviación típica; SE: Significación estadística

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los diferentes valores analíticos estudiados dependiendo del valor de ANA (+/-).



## 2. ESTUDIO RETROSPECTIVO

Estudio de cohortes retrospectivo en el que se procesó una muestra sanguínea de la cohorte expuesta (120 mujeres en las que el implante fue realizado entre 3 y 5 años atrás) y una de la cohorte no expuesta o control (120 mujeres sanas no menopáusicas, sin tipo alguno de cirugía estética, dentro del mismo rango de edad).

### 2.1. DESCRIPTIVOS

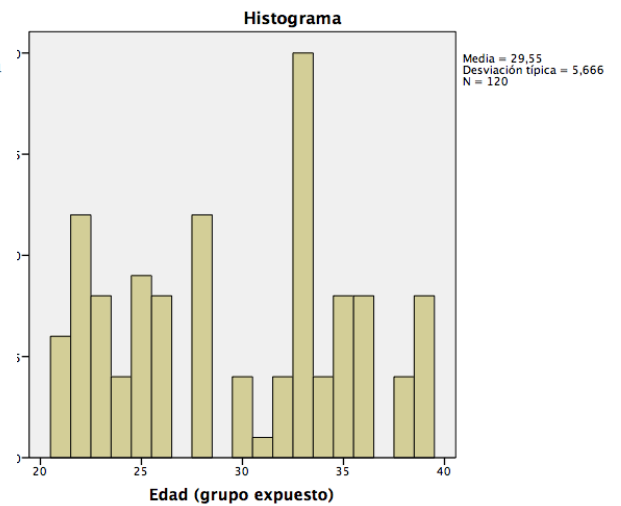
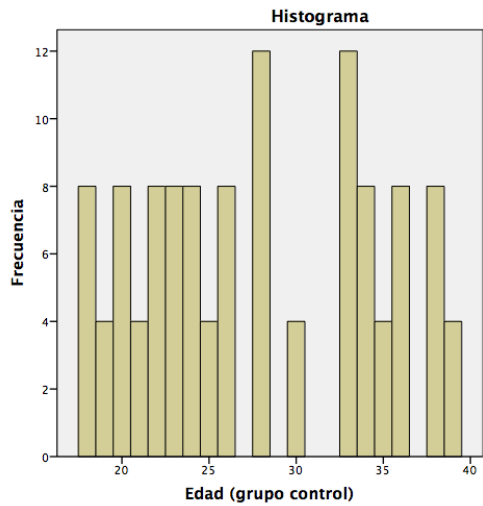
#### 2.1.1. ANÁLISIS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y SOCIODEMOGRÁFICAS

##### 2.1.1.1. EDAD, PESO

	Grupo	n	Media	DT*	Vm*	VM*
Edad (años)	Control	120	27,80	6,55	18	39
	Expuesto	120	29,55	5,67	21	39
Peso (Kg)	Control	120	56,50	6,78	46	69
	Expuesto	120	56,93	6,63	42	69

\* DT: Desviación típica; Vm: valor mínimo; VM: Valor máximo

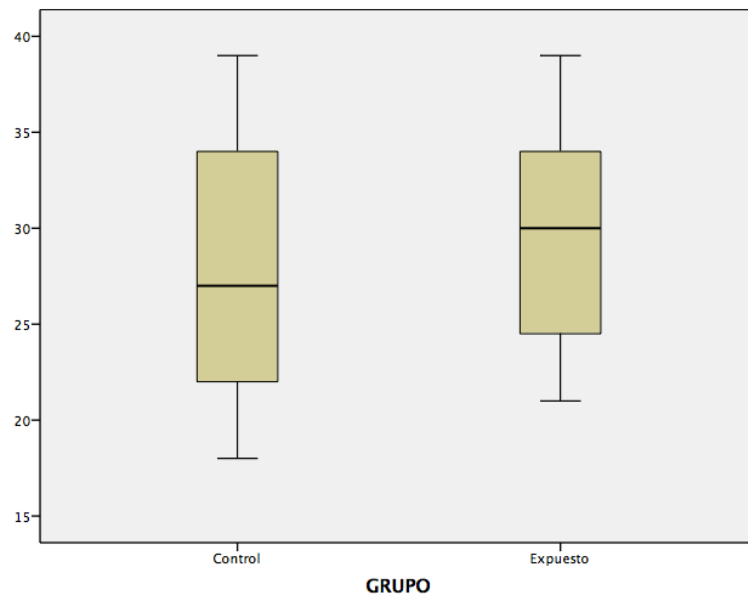
La edad media se sitúa en 27,8 años (D.T.=6,55) en el grupo control, y en 29,55 años (D.T. 5,67) en el grupo expuesto. La mitad de las mujeres tienen una edad inferior a 27 años en el grupo control e inferior a 30 en el grupo expuesto. Los coeficientes de asimetría (control  $z=0,73$ , exp.  $z=0,89$ ) y de curtosis (control  $z=2,53$ , exp.  $z=3,02$ ) permiten afirmar que la distribución de la edad no se asemeja a la distribución normal, lo que queda corroborado con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. ( $p>0,05$ ) para ambos grupos, tal y como se puede comprobar en las siguientes figuras:



**Pruebas de normalidad**

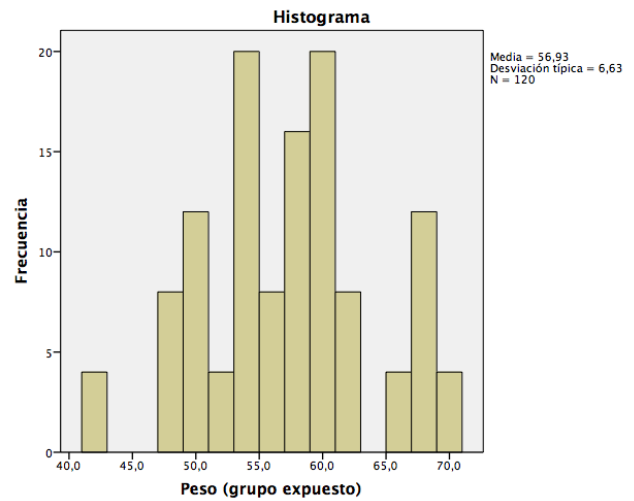
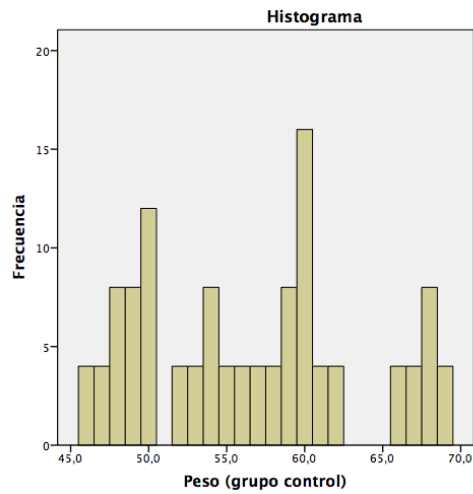
	GRUPO	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Edad	Control	,153	120	,000	,929	120	,000
	Expuesto	,162	120	,000	,925	120	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors



El peso medio se sitúa en 56,5 kg (D.T.=6,78) en el grupo control y en 56,93 (D.T.=6,63) en el grupo expuesto. La mitad de las mujeres tienen un peso inferior a 56,5 kg. en el grupo control e inferior a

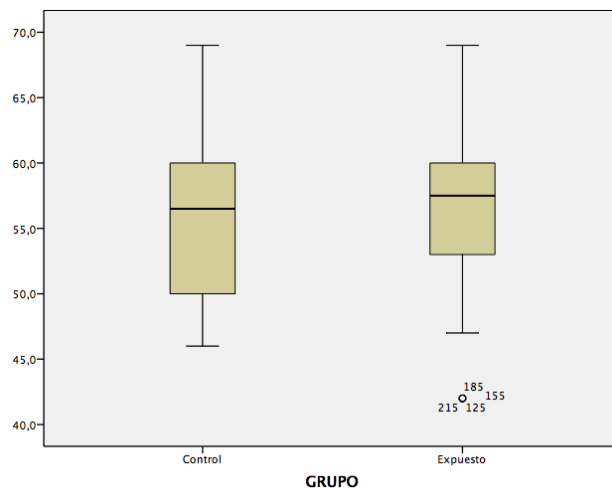
57,5 Kg. en el expuesto. Al igual que en la variable anterior, tanto la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ) para ambos grupos como los coeficientes de asimetría, (control  $z = 1,19$ , exp.  $z = 0,022$ ) y de curtosis (control  $z = 2,26$ , exp.  $z = 0,96$ ) no nos permite aceptar que la variable peso siga una distribución gaussiana, como se puede comprobar en las siguientes figuras:



**Pruebas de normalidad**

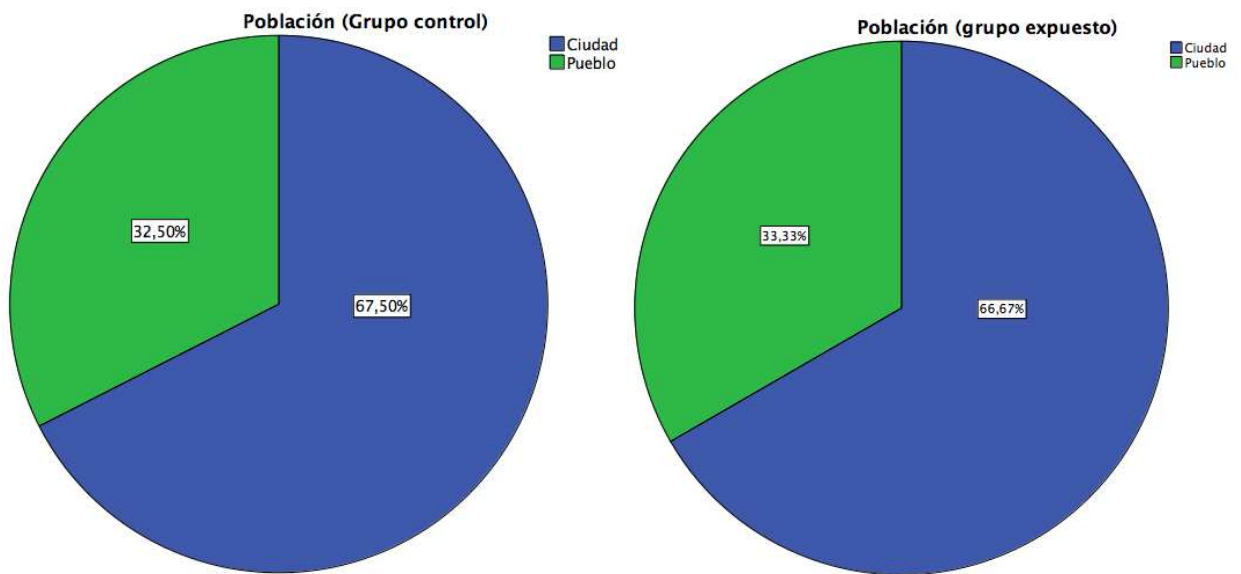
	GRUPO	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Peso	Control	,131	120	,000	,939	120	,000
	Expuesto	,089	120	,022	,968	120	,006

a. Corrección de la significación de Lilliefors



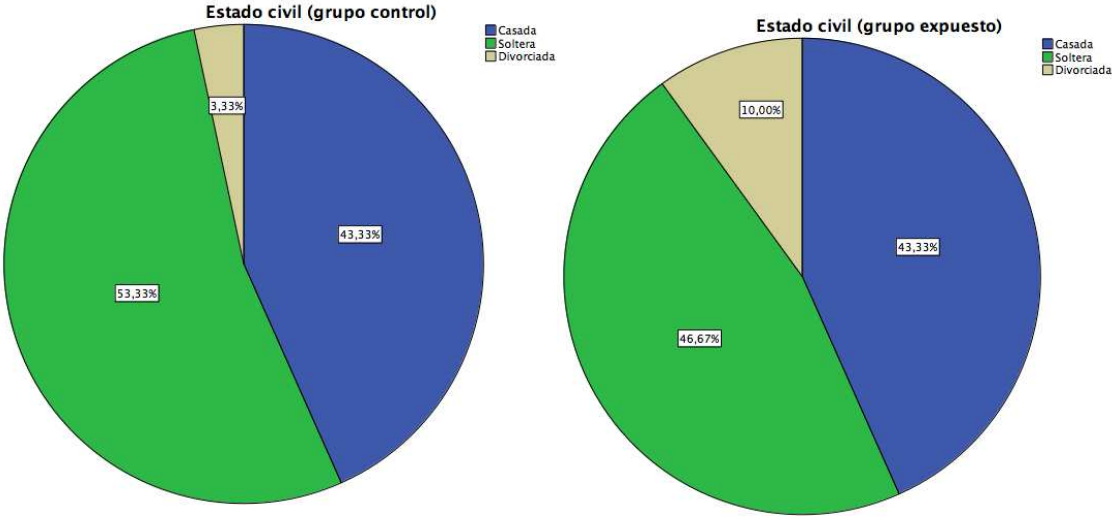
2.1.1.2. POBLACIÓN DE RESIDENCIA

	Población	Frecuencia
Grupo Control	<b>Ciudad</b>	81 (67,5%)
	<b>Pueblo</b>	39 (32,5%)
Grupo Expuesto	<b>Ciudad</b>	80 (66,7%)
	<b>Pueblo</b>	40 (33,3%)

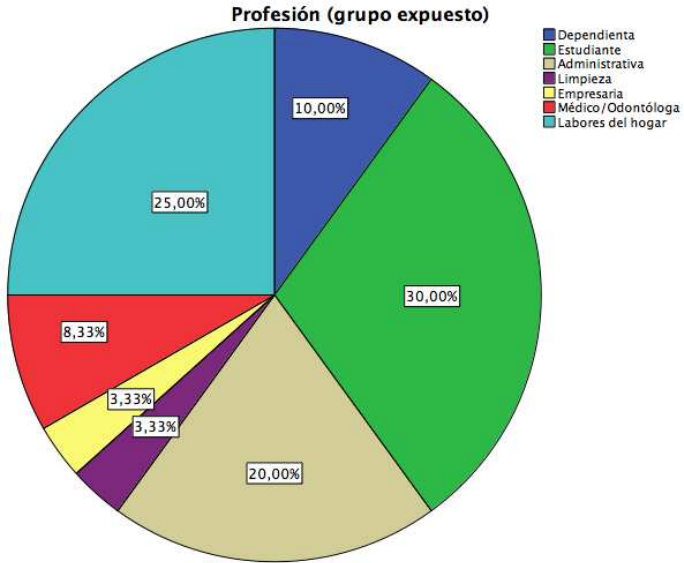
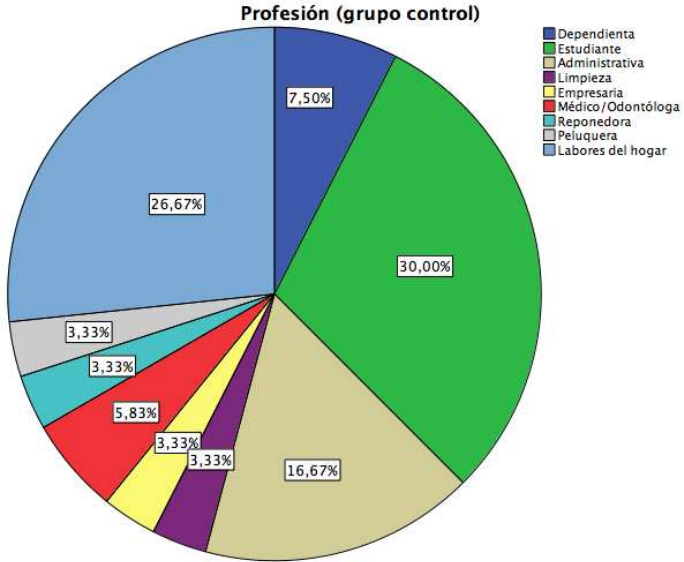


2.1.1.3. ESTADO CIVIL

	Estado civil	Frecuencia
Grupo Control	<b>Soltera</b>	64 (53,3%)
	<b>Casada</b>	52 (43,3%)
	<b>Divorciada</b>	4 (3,3%)
Grupo Expuesto	<b>Soltera</b>	56 (46,7%)
	<b>Casada</b>	52 (43,3%)
	<b>Divorciada</b>	12 (10%)

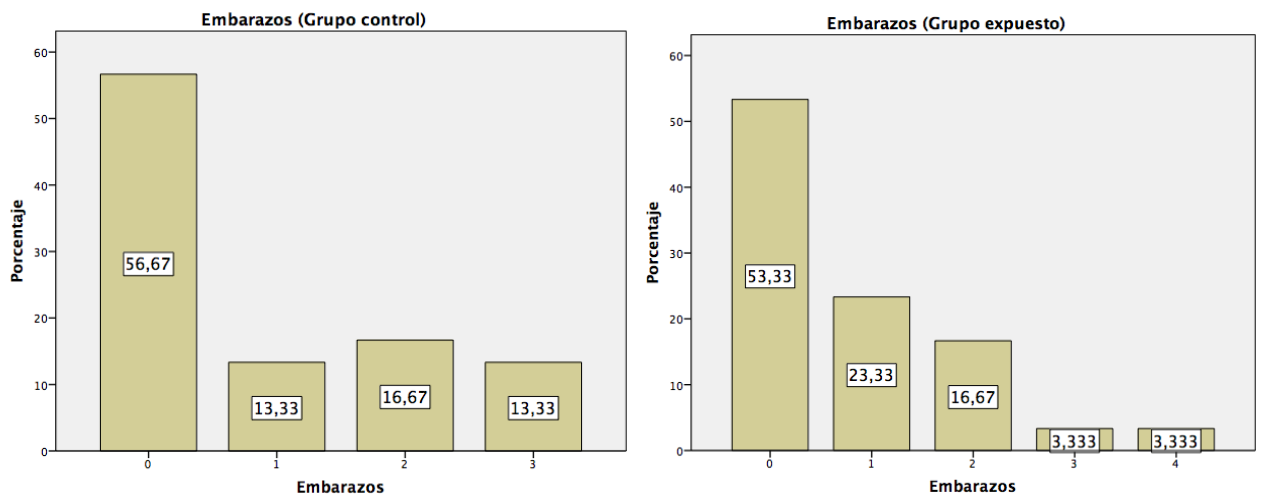


2.1.1.4. PROFESIÓN



Predominan claramente en ambos grupos las mujeres estudiantes (30% en ambos grupos), las que se dedican a labores del hogar (control: 26,7%; expuesto: 25%) y las administrativas (control: 16,7%; expuesto: 20%). Siguen en menor medida, el resto de profesiones.

**2.1.1.5. EMBARAZOS**



Podemos comprobar claramente una tendencia en la muestra analizada de que a mayor número de embarazos, menos cantidad de mujeres se operan para implante de mama.

**2.1.2. ANÁLISIS VARIABLES ANALÍTICAS**

	Grupo	n	media	DT*	SE*(p)
PCR	Control	120	1,13	0,564	0,253
	Expuesto	120	1,10	0,541	
IgA	Control	120	179,63	69,032	0,141
	Expuesto	120	169,60	71,799	
IgG	Control	120	907,20	181,109	0,341
	Expuesto	120	885,27	176,749	
IgM	Control	120	114,17	49,266	0,270
	Expuesto	120	107,30	46,128	
C3	Control	120	100,67	19,535	0,743
	Expuesto	120	101,63	20,157	
C4	Control	120	25,07	10,920	<b>0,032</b>
	Expuesto	120	27,30	11,083	
Leucocitos	Control	120	6,687	1,8075	0,114
	Expuesto	120	6,360	1,7092	
Linfocitos	Control	120	2,263	0,8416	0,602
	Expuesto	120	2,167	0,7399	
Linfocitos%	Control	120	33,823	7,8453	0,721
	Expuesto	120	33,947	9,0122	
FR	Control	120	21,33	7,512	0,114
	Expuesto	120	19,90	6,901	

**\*DT:**  
**desviación**  
**típica; SE:**  
**Significació**  
**n**  
**estadística**

En la tabla anterior se detallan los valores de las variables analizadas, tanto en el grupo intervención como en el grupo expuesto. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes análisis en ninguno de los casos excepto en el caso de C4, que se aprecia un incremento estadísticamente significativo en el grupo expuesto respecto al grupo intervención.

### **3. AUTOINMUNIDAD**

#### **3.1. ESTUDIO PROSPECTIVO**

De las 500 mujeres participantes los resultados de ANA preoperatorio positivos fueron 30 (6%). Posteriormente se les determinó con la misma muestra la batería de anticuerpos específicos que resultaron negativos en su totalidad.

Asimismo tras las determinaciones analíticas de la segunda muestra, 12 meses después de la intervención, no hubieron cambios en los resultados, es decir, las mujeres con ANA positivos y anticuerpos específicos negativos en la primera determinación siguieron igual en la segunda, y de las mujeres con ANA negativos en la primera ninguna positivizó en la segunda.

#### **3.2. ESTUDIO RETROSPECTIVO**

De las 120 participantes de la cohorte expuesta 7 resultaron con ANA positivos (5.8%) y de las 120 de la no expuesta los resultados positivos fueron 6 (5%).

Los anticuerpos específicos determinados posteriormente fueron negativos en ambos grupos.





# **DISCUSIÓN**



Del planteamiento general del trabajo surge una pregunta más que retórica ¿por qué hablamos de implantes mamarios con “cápsula periprotésica de silicona” y no de implantes rellenos de gel de silicona? Revisando la literatura existen estudios realizados que comprobaron que los implantes rellenos de suero salino eran una alternativa segura y eficaz, a los de gel de silicona<sup>148</sup> en prevención de posibles roturas y salida del contenido al interior del organismo. No obstante hay que tener en cuenta, y de ahí la pregunta inicial, que las posibles alteraciones inmunológicas dependerían de la superficie de contacto, la envoltura de la prótesis, que es similar en todos los tipos<sup>149</sup> y no del contenido de las mismas.

En otro orden de cosas, de sobras es conocido que desde hace ya más de cinco décadas vienen utilizándose ya sea en cirugía reconstructiva o por motivos estéticos los implantes quirúrgicos de prótesis mamarias con cápsula periprotésica de silicona<sup>140, 141</sup>. A pesar de que los implantes son considerados seguros, en algunas pacientes sin embargo, se ha descrito un grupo de síntomas similares a los de las llamadas enfermedades del tejido conectivo como artritis reumatoide, LES, síndrome de Sjögren o polimiositis. En la actualidad todavía las presuntas secuelas inmunológicas no se han confirmado y siguen causando controversia<sup>142, 143</sup>. Es por ese motivo que, a día de hoy, algunos autores sugieren que no se puede establecer una relación entre esta posible reacción inmune al implante con cápsula periprotésica de silicona y una frecuencia creciente de alteraciones reumáticas<sup>144</sup>.

Hasta tal punto viene siendo la polémica que en el año 2003 la Federación de Alimentos y Drogas (FDA) de los EE.UU. recomendó que los implantes de silicona fueran utilizados en contadas ocasiones como podría ser en cirugía reconstructiva y como parte de ensayos clínicos<sup>147</sup>. Hay que tener en cuenta que la silicona no es una sustancia inerte y los compuestos de la misma se pueden encontrar en la sangre y en el hígado de mujeres con implante mamario de silicona. No tenemos muy lejano los casos de las prótesis *PIP* manufacturadas de forma maliciosa con relleno de gel de silicona de baja calidad y que tantos problemas han causado en los casos de rotura de las mismas<sup>155</sup>.

En ese mismo año 2003, y tras la restricción antes comentada de la FDA al uso de las prótesis mamarias de silicona, Bar-Meir, Eherenfeld y Shoenfeld realizaron una revisión de la literatura de los últimos años concluyendo que pese a la existencia de grandes meta-análisis ninguno fue capaz de establecer una asociación clínica entre los implantes mamarios de gel de silicona y las enfermedades autoinmunes<sup>156</sup>. En nuestro estudio, en contraposición con este tipo de estudios clínicos, se ha investigado a nivel bioquímico si el implante de las prótesis produce algún cambio en la inmunidad de las mujeres portadoras, ya sea en el mismo grupo de mujeres antes y después del implante (estudio prospectivo) como comparando un grupo de mujeres operadas con otro grupo control similar sin implantes (estudio retrospectivo). Los resultados en ambos estudios resultaron superponibles ya que no aparecen alteraciones inmunitarias en las mujeres del estudio prospectivo tras someterse al implante ni diferencias entre las mujeres operadas y el grupo control del estudio retrospectivo.

Siguiendo con la controversia en 2011 Shoenfeld describió un nuevo síndrome llamado "ASIA" (*Autoimmune/Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants*), definido para agrupar por primera vez el conjunto de patologías inmunomediadas provocadas por un estímulo adyuvante como pueden ser la exposición crónica a silicona, tetramethylpentadecano, pristano, aluminio y otros adyuvantes<sup>152</sup>. Pese a todo, la causalidad es difícil de probar porque ASIA sólo se desarrolla en una pequeña parte de pacientes expuestos a estos adyuvantes<sup>153</sup>. Más tarde ya fue relacionado con los implantes mamarios de silicona<sup>143</sup>.

En cuanto a nuestro trabajo intenta rellenar un hueco existente en la literatura con respecto al tema. Existen multitud de trabajos desde los años 80 intentado demostrar o rebatir la relación entre las prótesis mamarias de silicona y la aparición de enfermedades o síntomas de enfermedades reumáticas<sup>147</sup>, pero los planteamientos son, en general desde el punto de vista clínico con menos atención a los cambios bioquímicos o los tratan de soslayo o sobre enfermedades en particular<sup>142</sup>, a diferencia de nosotros que abarcamos una amplia batería de pruebas, que abarcan desde parámetros generales hematológicos e inmunológicos para descartar patologías de base que pudieran interferir en los resultados hasta determinaciones de parámetros que aparecen en alteraciones inmunes y autoinmunes.

Otra diferencia con otros estudios ya realizados es en la selección de las participantes. En nuestro caso hemos seleccionado mujeres sanas cuya intención al someterse a los implantes era meramente estética con lo que evitamos situaciones patológicas que podrían interferir en la inmunidad como ocurre con el estudio de Contant, Swaak, Obdeijn, et al en el que se plantearon la relación de los implantes con el "Complejo de síntomas relacionados con la silicona" (SRSC) en mujeres sometidas a los mismos a causa de mastectomías por cáncer<sup>157</sup> (no obstante, al igual que en nuestro estudio, no encontraron correlación entre una elevación del "score" del SRSC y cambios en la presencia de los ANA) o el de Brunner, Feller, Groner, et al que estudiaron cambios en la inmunología (aumento de C3 y C4 y de anticuerpos antimicrosomales y antiroideos) en mujeres portadoras de implantes que habían tenido como complicación retracción capsular según la clasificación de Baker<sup>158</sup>, con éste último sí que aparece una coincidencia en nuestro estudio al encontrar un aumento estadísticamente significativo de C3 y C4 a los 12 meses del implante y de C4 a los 3-5 años.

Por todo lo expuesto anteriormente nos planteamos como hipótesis de trabajo la existencia de alteraciones inmunitarias en general y de una respuesta autoinmune en particular en mujeres relacionadas con los implantes mamarios con cápsula periprotésica de silicona.

Nuestro objetivo ha sido, por tanto, aceptar o rechazar esa hipótesis comprobando las posibles alteraciones inmunitarias y la existencia o no de una respuesta autoinmune en dichas mujeres mediante dos estudios, uno longitudinal prospectivo y otro de cohortes retrospectivo.

En el estudio prospectivo el primer resultado que llama la atención es la presencia preoperatoria de ANA con resultado positivo en 30 mujeres (6%) a las que se les determinó a posteriori con la misma muestra la batería de anticuerpos específicos que resultaron negativos en su totalidad. Asimismo en el retrospectivo sucedió algo similar con 7 pacientes ANA positivos (5.8%) en la cohorte expuesta y 6 (5%) en la no expuesta y anticuerpos específicos negativos en ambos grupos. Estos resultados concuerdan con los valores hallados en la revisión de la literatura existente en donde se constata una prevalencia de los ANA en personas sanas entre el 1 y el 15% con una media en torno al 6%<sup>30, 31</sup>.

Asimismo en el estudio prospectivo, y tras las determinaciones analíticas de la segunda muestra, se aprecia ausencia de cambios en los resultados, es decir, las mujeres con ANA positivos y anticuerpos específicos negativos en la primera determinación siguieron igual en la segunda, y de las mujeres con ANA negativos en la primera ninguna positivizó en la segunda.

Además en el resto de las demás determinaciones de los dos estudios, tanto a nivel de inmunidad humoral (inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM, C3 y C4, FR), como celular (leucocitos y porcentaje de linfocitos) con respecto al implante de las prótesis solo se aprecian los cambios en C3 y C4 mencionados con anterioridad aunque dicho aumento sea siempre dentro de los rangos de normalidad (valores fisiológicos).

Por tanto, en base a los resultados, podemos descartar la hipótesis inicial al no haber encontrado relación entre el implante de prótesis mamarias con cápsula periprotésica de silicona y la aparición de alteraciones inmunitarias y autoinmunitarias.

# **CONCLUSIONES**





1. En el estudio prospectivo no se encontró relación entre la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) y el implante de las prótesis mamarias, con valores similares a la prevalencia de los mismos en personas sanas (6%).
2. En el estudio retrospectivo tampoco se encontró relación entre la presencia de los anticuerpos antinucleares (ANA) y el implante de las prótesis mamarias, con valores similares a la prevalencia de los mismos en personas sanas tanto en la cohorte expuesta (5.8%) como en la no expuesta (6%).
3. Existe una clara tendencia a la disminución del número de mujeres que se someten a intervenciones para implantes conforme aumenta su número de embarazos.
4. En el estudio retrospectivo tampoco se encontró relación entre la presencia de los anticuerpos antinucleares (ANA) y el implante de las prótesis mamarias, con valores similares a la prevalencia de los mismos en personas sanas tanto en la cohorte expuesta (5.8%) como en la no expuesta (6%).
5. Basándonos, pues, en los resultados, se descarta la hipótesis inicial al no haber encontrado relación entre el implante de prótesis mamarias con cápsula periprotésica de silicona y la aparición de alteraciones inmunitarias y autoinmunitarias.

## **POSIBLES LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

1. Con nuestro estudio lo que esperamos aportar es una visión más general desde el punto de vista bioquímico que clínico con una amplia batería de anticuerpos y determinaciones analíticas que nos permita minimizar al máximo la posibilidad de error a la hora de relacionar cualquier síntoma que aparezca con posterioridad y que pudiera ser achacado a enfermedades autoinmunes relacionadas con los implantes.

2. Queda una puerta abierta para proseguir la investigación intentando extenderla a pacientes sometidas a mastectomía terapéutica que en nuestro estudio no han sido tenidas en cuenta para poder generalizar más la aplicación de los resultados.
  
3. También parecería apropiado combinar con un estudio del tipo del nuestro otro tipo clínico para poder descartar de manera más precisa la aparición de enfermedades autoinmunes relacionadas con los implantes pese a que aparezca algún síntoma que pudiera semejar dichas enfermedades, realizando, además, un seguimiento más amplio en el tiempo.

# **BIBLIOGRAFÍA**



1. **Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS.** Inmunología celular y molecular. Madrid, McGraw Hill-Interamericana, 1999.
2. **Elgert KD.** Immunology: Understanding the immune system. New York, Wiley-Liss, 1996.
3. **Janeway CA, Travers P, Walport M, et al.** Immunobiology, the immune system in health and disease. 5ª ed. New York, Garland Publishing, 2001.
4. **González JM, González C.** El sistema inmunitario. En: Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos. Barcelona, Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2000; 11-30.
5. **Yu C, Gershwin ME, Chang C.** Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. J Autoimmun. 2014 Feb-Mar; 48-49:10-3.
6. **Reveille JD.** Predictive value of autoantibodies for activity of systemic lupus erythematosus. Lupus 2004; 13: 290-7.
7. **Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, García Hernández FJ.** Síndrome de Sjögren. En: Enfermedades autoinmunes sistémicas (Manual de información para pacientes y familiares). Asociación de Autoinmunes y Lúpicos de Sevilla, 2010; 143-58.
8. **Marie I, Josse S, Decaux O, et al.** Comparison of long-term outcome between anti-Jo1- and anti-PL7/PL12 positive patients with antisynthetase syndrome. Autoimmun Rev. 2012; 11(10): 739-45
9. **González JM, González C.** Autotolerancia y autoinmunidad. En: Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos. Barcelona, Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2000; 33.
10. **Janeway CA, Travers P, Walport M, et al.** Immune responses in the absence of infection. En: Immunobiology, the immune system in health and disease. 5ª ed. New York, Garland Publishing, 2001; 11-5.
11. **Janeway CA, Travers P, Walport M, et al.** Immune responses in the absence of infection. En: Immunobiology, the immune system in health and disease. 5ª ed. New York, Garland Publishing, 2001; 11-28.

12. **Schwartz RS.** Autoimmunity and immune diseases. En: Pau WE, ed. Fundamental immunology. New York, Raven Press, 1993; 1043-5.
13. **Von Feldt, J.** Antinuclear Antibodies (ANA). American College of Rheumatology, 2012 1-4.
14. **González JM, González C.** Autotolerancia y autoinmunidad. En: Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos. Barcelona, Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2000; 39.
15. **Sang A, Yin Y, Zheng YY, Morel L.** Animal models of molecular pathology systemic lupus erythematosus. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012; 105: 321-70.
16. **Roitt I, Brostoff J, Male D, eds.** Autoinmunidad y enfermedades autoinmunitarias. Inmunología, Harcourt Brace, 1997; 27: 4.
17. **Schwartz RS.** Autoimmunity and immune diseases. En: Pau WE, ed. Fundamental immunology. New York, Raven Press, 1993; 1046-7.
18. **Fonollosa V, Labrador M, Vilardell M.** Anticuerpos antinucleares en la práctica clínica. Formación médica continuada 2002; 9: 713.
19. **Tonuttia E, Bassetti D, Piazza A, et al.** Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. Autoimmunity 2004; 37: 171-6.
20. **Hollingstworth PNH, Pummery SC, Dawkins RL.** Antinuclear antibodies. En: Peter JB, Schoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam, Elsevier Science B.V., 1996; 74-90.
21. **Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ.** Importance of the dense fine speckled pattern on Hep-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2012 Jul; 11(9): 642-5.
22. **Núñez A, Wichmann I, García JR.** Caracterización de los ANAs en el laboratorio. Inmunofluorescencia indirecta. En: Anticuerpos antinucleares Sevilla, Roche Diagnostics S.L., 2000; 17-20.
23. **Pereira IL, Fuentes J.** Propuesta de nomenclatura: sustitución de título por concentración. Quim Clin 1993; 12: 457.

24. **Mahler M, Fritzler MJ.** The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 494356.
25. **Zuchner D, Sternsdorf T, Szostecki C, et al.** Prevalence, kinetics and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliar cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26: 1123-30.
26. **Núñez A, Wichmann I, García JR.** Secuencia de estudio de los autoanticuerpos en el laboratorio clínico. En: *Anticuerpos antinucleares.* Sevilla, Roche Diagnostics S.L., 2000; 30.
27. **Rondeel JMM.** Immunofluorescence versus ELISA for the detection of antinuclear antigens. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2: 226-32.
28. **Reisner BS, DiBlasi J, Goel N.** Comparison of an enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of antinuclear antibodies. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 503-6.
29. **Lemarié R, Jacomet F, Goutte B, Bonnafoux C, Tridon A, Evrard B.** The anti-dsDNA antibodies: validation of an original two step strategy of detection. *Ann Biol Clin (Paris).* 2011 Jan-Feb; 69(1): 47-53.
30. **De Blam K, Keyser F, Verbruggen G, et al.** Detection and identification of antinuclear antibodies in the serum of blood donors. *Clin Exp Immunol* 1993; 11: 393-7.
31. **Vrethem M, Skogh T, Berlin G, et al.** Autoantibodies versus clinical symptoms in blood donors. *J Rheumatol* 1992; 19: 1919-21.
32. **Adams BB, Mutasim DF.** The diagnostic value of antinuclear antibody testing. *Int J Dermatol* 2000; 39: 887-91.
33. **Evelyn Silva C.** Inmunopatogenia del Lupus Eritematoso Sistémico, parte II: Rol de los Componentes del Sistema Inmune y de los Autoanticuerpos. *Rev. chil. reumatol.* 2009; 25(4):140-147.
34. **González DA, León AC, Varela AR, et al.** Autoantibody detection with indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: starting serum dilutions for systemic rheumatic diseases. *Immunol Lett.* 2011 Oct 30; 140(1-2): 30-5.

35. **Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, et al.** Guidelines for the laboratory use of the autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 316-24.
36. **Suárez-Almazor ME, González-López L, Gámez-Nava JI, et al.** Utilization and predictive value of laboratory test in patients referred to rheumatologists by primary care physicians. *J Rheumatol* 1998; 25: 1980-5.
37. **Lane SK, Gravel JW.** Clinical utility of common serum rheumatologic test. *Am Fam Physician* 2002; 65: 1073-80.
38. **Bonnote B, Gresset AC, Chauffert B, et al.** Early signs of systemic disease in patients taking minocycline chlorhydrate. *Presse Med* 1999; 28: 1105-8.
39. **Angulo JM, Sigal LH, Espinoza LR.** Coexistent minocycline-induced systemic lupus erythematosus and autoimmune hepatitis. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 28: 187-92.
40. **Elkayam O, Levartovsky D, Brautbar C, et al.** Clinical and immunological study of 7 patients with minocycline-induced autoimmune phenomena. *Am J Med* 1998; 105: 484-7.
41. **Naleway AL.** Polymorphous light eruption. *International Journal of Dermatology* 2002; 41: 377-383.
42. **European Association for the Study of the Liver.** EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2011; 55(2): 245-264.
43. **Parés A.** Primary sclerosing cholangitis: diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol.* 2011; 34: 41-52.
44. **Ortel TL.** Antiphospholipid syndrome: laboratory testing and diagnostic strategies. *Am J Hematol.* 2012 May; 87 Suppl 1:S75-81.
45. **Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, et al.** The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42: 534-40.
46. **Hiepe F, Dörner T, Burnester GR.** Antinuclear antibody and extractable nuclear antigen related diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 5-9.



47. **González JM, González C.** Técnicas analíticas en los estudios de autoinmunidad. En: Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos. Barcelona, Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2000; 47-57.
48. **Janeway CA, Travers P, Walport M, et al.** The induction, measurement and manipulation of the immune response. En: Immunobiology, the immune system in health and disease. 5ª ed. New York, Garland Publishing, 2001; 21-4.
49. **Beckingham JA, Cleary J, Bobeck M, et al.** Kinetic analysis of sequence specific recognition of ssDNA by autoantibodies. *Biochemistry* 2003; 42: 4118-26.
50. **Viriyataveekul R, Kobkitjaroen J, Jaiyen J, et al.** Evaluation of five commercial assays for the detection of anti-dsDNA antibodies: three *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test kits and two enzyme immunoassay kits. *J Med Assoc Thai.* 2014 Feb; 97(2): 220-4.
51. **Busser BW, Adair BS, Erikson J, et al.** Activation of diverse repertoires of autoreactive T cells enhances the loss of anti-dsDNA B cell tolerance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1361-71.
52. **Reichlin M.** Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins. *J Autoimmun* 1998; 11: 557-61.
53. **Núñez A, Wichmann I, García JR.** Significación clínica de los ANAs. En: Anticuerpos antinucleares. Sevilla, Roche Diagnostics S.L., 2000; 39.
54. **Suh-Lailam BB, Chiaro TR, Davis K W, et al.** Evaluation of a high avidity anti-dsDNA IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011; 4(8): 748-54.
55. **Forger F, Matthias T, Oppermann M, et al.** Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotopes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. *Lupus* 2004; 13: 36-44.
56. **Villalta D, Bizzaro N, Bassi N et al.** Anti-dsDNA antibody isotopes in systemic lupus erythematosus: IgA in addition to IgG anti-dsDNA help to identify glomerulonephritis and active disease. *PLoS One.* 2013; 8(8): e71458.

57. **Monestier M.** Autoantibodies to nucleosomes and histone-DNA complexes. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 1997; 1446-55.
58. **Berden JH, Grootsholten C, Jurgen WC, et al.** Lupus nephritis: a nucleosome waste disposal defect? *J Nephrol* 2002; 15 Suppl 6: s1-10.
59. **Doria A, Gatto M.** Nephritogenic-antinephritogenic antibody network in lupus glomerulonephritis. *Lupus*. 2012 Dec; 21(14):1492-6.
60. **Bruns A, Blass S, Hausdorf G, et al.** Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2307-15.
61. **Ravirajan CT, Rowse L, McGowan JR, et al.** An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patient with systemic lupus erythematosus: a cross sectional study. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 1405-12.
62. **Abdel Gawad ER, Mansour AI, Abdel Aziz YA, Soliman AF, Fawzy RM.** Role of anti-nucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus and as a marker for lupus nephropathy. *Egypt J Immunol*. 2014; 21(1): 57-65.
63. **Fonollosa V, Labrador M, Vilardell M.** Anticuerpos antinucleares en la práctica clínica. *Formación médica continuada* 2002; 9: 714.
64. **Oke V, Wahren-Herlenius M.** Cutaneous lupus erythematosus: clinical aspects and molecular pathogenesis. *J Intern Med*. 2013 Jun; 273(6): 544-54.
65. **Fonollosa V, Labrador M, Vilardell M.** Anticuerpos antinucleares en la práctica clínica. *Formación médica continuada* 2002; 9: 716.
66. **Dana E. Habash-Bseiso, MD; Steven H. Yale, MD; Ingrid Glurich, PhD, et al.** Serologic Testing in Connective Tissue Diseases. *Clin Med Res* 2005 3:190-193.
67. **Zimmerman C, Smolen JS, Graninger W, et al.** Fine specificity of anti-Ro (SS-A) antibodies and clinical manifestations in patients with SLE. *J Rheumatol* 1996; 23: 1897-1903.
68. **Singalavanija S, Limpongsanurak W, Aoongern S.** Neonatal lupus erythematosus: a 20-year retrospective study. *J Med Assoc Thai*. 2014 Jun; 97 Suppl 6: S74-82.
69. **Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, et al.** Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2011 Jan; 10(3): 150-4.

70. **Mimori T, Imura Y, Nakashima R, et al.** Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol.* 2007 Nov; 19(6): 523-9.
71. **Caro Pérez A, Kumble S, Kumble KD, et al.** Evaluation of a multiplex ELISA for autoantibody profiling in patients with autoimmune connective tissue diseases. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014: 896787.
72. **Yang Z, Liang Y, Zhong R.** Is identification of anti-SSA and/or -SSB antibodies necessary in serum samples referred for antinuclear antibodies testing? *J Clin Lab Anal.* 2012 Nov; 26(6): 447-51.
73. **Hon KL, Leung AK.** Neonatal lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2012; 2012: 301274.
74. **Kim Y, Park Y, Lee EY, et al.** Comparison of automated multiplexed bead-based ANA screening assay with ELISA for detecting five common anti-extractable nuclear antigens and anti-dsDNA in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta.* 2012 Jan 18; 413(1-2): 308-11.
75. **Emanuele Cozzani, Massimo Drosera, Giulia Gasparini, et al.** Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014: 321359.
76. **Hof D, Cheung K, de Rooij DJ, et al.** Autoantibodies specific for apoptotic U1-70K are superior serological markers for mixed connective tissue disease. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R302-9.
77. **Benito-García E, Schur PH, Lahita R.** Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-Sm and anti-RNP antibody tests. *Arthritis Rheum* 2004; 51 (6): 1030-44.
78. **Annia Mesa, Jason A. Somarelli, Wensong Wu, et al.** Differential immunoglobulin class-mediated responses to components of the U1 small nuclear ribonucleoprotein in Systemic Lupus Erythematosus and Mixed Connective Tissue Disease. *Lupus* Nov 2013; 22(13): 10.1177/0961203313508444.
79. **Ruiz M, Labrador M, Selva A.** Undifferentiated, overlapping and mixed connective tissue diseases. *Med Clin (Barc)* 2004; 123: 712-7.

80. **Núñez A, Wichmann I, García JR.** Autoanticuerpos: asociaciones clínicas y prevalencia. En: Anticuerpos antinucleares. Sevilla, Roche Diagnostics S.L., 2000; 34.
81. **Ho KT, Reveille JD.** The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 81.
82. **Kuwana M, Kaburaki J, Medsger TA, et al.** An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1179-88.
83. **Basu D, Reveille JD.** Anti-scl-70. *Autoimmunity*. 2005 Feb; 38(1): 65-72.
84. **Lorenzo Beretta, Blanca Rueda, Maurizio Marchini, et al.** Analysis of Class II human leucocyte antigens in Italian and Spanish systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Jan; 51(1): 52-9.
85. **Ho KT, Reveille JD.** The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 83-4.
86. **Fonollosa V, Labrador M, Vilardell M.** Anticuerpos antinucleares en la práctica clínica. *Formación médica continuada* 2002; 9: 715.
87. **Monroy A.** Inmunoensayos. <https://es.scribd.com/doc/243861833/inmunoensayos-docx> 21-10-2014.
88. **Dewan V, Reader J, Forsyth KM.** Role of aminoacyl-tRNA synthetases in infectious diseases and targets for therapeutic development. *Top Curr Chem* 2014; 344: 293-32.
89. **Mirrakhimov AE.** Antisynthetase syndrome: a review of etiopathogenesis, diagnosis and management. *Curr Med Chem* 2015; 22(16): 1963-75.
90. **Waalder E.** On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1940; 17: 172-88.
91. **Rose HM, Ragan C, Pearce F, et al.** Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948; 68: 1-6.
92. **Pike RM, Sulkin SE, Coggeshall HC.** Serological reactions in rheumatoid arthritis. II. Concerning the nature of the factor in rheumatoid arthritis serum responsible for the increased agglutination of sensitized sheep erythrocytes. *J Immunol* 1949; 63: 447-63.

93. **Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, et al.** An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1957; 103: 425-38.
94. **Song YW, Kang EH.** The pathogenic role of rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheum* 2013; 5(6): 651-658.
95. **Fahim Khan.** The role of rheumatoid factor in the diagnosis of rheumatoid arthritis. [www.arthritisandpainclinic.com/pdf/rheumatoid-factor-diagnosis-rheumatoid-arthritis.pdf](http://www.arthritisandpainclinic.com/pdf/rheumatoid-factor-diagnosis-rheumatoid-arthritis.pdf). 18-10-2012: 11-12.
96. **Song YW, Kang EH.** Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM* 2010 Mar; 103(3): 139-146.
97. **Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R.** Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Dis Markers*. 2013; 35(6): 727-734.
98. **Singer J.** On standardization of the latex fixation. *Bull Rheum Dis* 1975; 26: 868-74.
99. **Wernick R, Lospatullo JJ, Fink CW, et al.** Serum IgG and IgM rheumatoid factors by solid phase radioimmunoassay. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1501-11.
100. **Gioud-Paquet M, Auvinet M, Raffin T, et al.** IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 65-71.
101. **Larkin JG, Sturrock RD, Stimson WH.** A rapid enzyme immunoassay for the detection of IgM rheumatoid factor: a comparison of "sero-negative" and "sero-positive" rheumatoid patients. *J Clin Lab Immunol* 1986; 20: 207-9.
102. **Roberts-Thomson PJ, McEvory R, Laughans T, et al.** Routine quantification of rheumatoid factor by rate nephelometry. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 379-83.
103. **Abdul-Aziz K, Faizal AA.** Evaluation of rheumatoid factor by a new latex enhanced immuno-turbidimetric assay. *Saudi Med J* 2004; 25: 1768-9.
104. **Rocha KC, da Fonseca Brinque LA, G. B. Oliveira C, et al.** Estudo comparativo entre as técnicas de aglutinação em látex e de imunoturbidimetria para a detecção de fator reumatoide. *J Bras Patol Med Lab* Jan./Feb. 2013; (49)1.

105. **Sibila J.** Autoantibodies, diagnostic and prognostic markers of rheumatoid polyarthritis. *Presse Med* 2000; 29: 1723-30.
106. **Ota T.** Present status and problems with rheumatoid factor as a laboratory test. *Rinsho Byori* 2003; 51: 649-55.
107. **Britsemmer K, Ursum J, Gerritsen M, et al.** Validation of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: slight improvement over the 1987 ACR criteria. *Ann Rheum Dis* 2011 Aug; 70(8): 1468-70.
108. **Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R.** Rheumatoid factors: clinical applications. *Dis Markers* 2013; 35(6): 727-34.
109. **Holers VM.** Insights from populations at risk for the future development of classified rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2014 Nov; 40(4): 605-20.
110. **Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al.** Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380.
111. **Avdeeva AS, Aleksandrova EN, Novikov AA, et al.** The immunologic predictors of effect of anti-B-cell therapy under rheumatoid arthritis. *Klin Lab Diagn* 2014 Mar; (3): 48-52.
112. **Westwood OM, Nelson PN, Hay FC.** Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(4): 379-85.
113. **Bridges SL.** Update on autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6: 343-50.
114. **Simard JF, Holmqvist M.** Rheumatoid factor positivity in the general population. *BMJ* 2012 Sep 6; 345: e5841.
115. **Wassermann VA, Neisser A, Bruck C.** Eine serodiagnostische reaktion bei Syphilis. *Deuts Med Wochens* 1906; 19: 745-6.
116. **Pangborn MD.** Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *J Biol Chem* 1942; 142: 247-56.

117. **Moore JE, Lutz WB.** The natural history of systemic lupus erythematosus: an approach to its study through chronic biologic false positive reactors. *J Chronic Dis* 1955; 1: 297-316.
118. **Hughes GRV.** Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. *Br Med J* 1983; 287: 1088-9.
119. **Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al.** Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; ii: 1211-4.
120. **Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, et al.** Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantification of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 738-45.
121. **McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, et al.** Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4.
122. **Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al.** Anticardiolipin antibodies (ACA) are directed not to cardiolipin but a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-7.
123. **Harris EN, Loizou S, Englert H, et al.** Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant. *Lancet* 1984; ii: 1099.
124. **Willis R, Lakos G, Harris EN.** Standardization of antiphospholipid antibody testing--historical perspectives and ongoing initiatives. *Semin Thromb Hemost* 2014 Mar; 40(2): 172-7.
125. **Roubey de Groot PG, Urbanus RT.** The significance of autoantibodies against  $\beta$ 2-glycoprotein I. *Blood* 2012 Jul 12; 120(2): 266-74.
126. **Hughes GVR, Harris EN, Gharavi AE.** The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13: 486-9.
127. **Fickentscher C, Magorivska I, Janko C, et al.** The Pathogenicity of Anti- $\beta$ 2GP1-IgG Autoantibodies Depends on Fc Glycosylation. *J Immunol Res* 2015; 2015: 638129.
128. **Meroni PL, Raschi E, Grossi C, et al.** Obstetric and vascular APS: same autoantibodies but different diseases? *Lupus* 2012 Jun; 21(7): 708-10.

129. **D'Ippolito S, Meroni PL, Koike T, et al.** Obstetric antiphospholipid syndrome: a recent classification for an old defined disorder. *Autoimmun Rev* 2014 Sep; 13(9): 901-8.
130. **Rodríguez-Sanz A, Martínez-Sánchez P, Prefasi D, et al.** Antiphospholipid antibodies correlate with stroke severity and outcome in patients with antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity* 2015 Aug; 48(5): 275-81.
131. **Meijide H, Sciascia S, Sanna G, et al.** The clinical relevance of IgA anticardiolipin and IgA anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antiphospholipid antibodies: a systematic review. *Autoimmun Rev* 2013 Jan; 12(3): 421-5.
132. **Chighizola CB, Ubiali T, Meroni PG.** Treatment of Thrombotic Antiphospholipid Syndrome: The Rationale of Current Management—An Insight into Future Approaches. *J Immunol Res* 2015; 2015: 951424.
133. **Oku K, Amengual O, Hisada R, et al.** The function and the significance of full-automated tests for detecting antiphospholipid antibodies. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2015; 38(3): 157-63.
134. **Tincani A, Casu C, Cartella S, et al.** Antiphospholipid antibody: laboratory, pathogenesis and clinical manifestations. *Reumatismo* 2010 Jan-Mar; 62(1): 65-75
135. **Gerhardsson J, Sundelin B, Zickert A, et al.** Histological antiphospholipid-associated nephropathy versus lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus: an observational cross-sectional study with longitudinal follow-up. *Arthritis Res Ther* 2015; 17(1): 109.
136. **Singer EJ, Valdes-Sueiras M, Commins DL, et al.** HIV stroke risk: evidence and implications. *Ther Adv Chronic Dis* 2013 March; 4(2): 61–70.
137. **Arion Laboratoires®.** Implants mammaires monobloc® 2001; 3-7.
138. **Medical Service®.** Catálogo de productos 2000; 2-4, 15-6.
139. **Fischer S, Hirche C, Reichenberger MA, et al.** Silicone Implants with Smooth Surfaces Induce Thinner but Denser Fibrotic Capsules Compared to Those with Textured Surfaces in a Rodent Model. *PLoS One* 2015 Jul 7; 10(7): e0132131.
140. **Van Zele, Heymans O.** Breast implants. A review. *Acta Chir Belg* 2004; 104: 158-65.



141. **O'Shaughnessy K.** Evolution and update on current devices for prosthetic breast reconstruction. *Gland Surg* 2015 Apr; 4(2):97-110.
142. **Speck-Hernandez CA, Montoya-Ortiz G.** Silicon, a Possible Link between Environmental Exposure and Autoimmune Diseases: The Case of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis* 2012; 2012:604187.
143. **Goren I, Segal G, Shoenfeld Y.** Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvant (ASIA) evolution after silicone implants. Who is at risk? *Clin Rheumatol* 2015 Apr 16. [Epub ahead of print].
144. **Lipworth L, Holmich LR, McLaughlin JK.** Silicone breast implants and connective tissue disease: no association. *Semin Immunopathol* 2011 May; 33(3): 287-94.
145. **Bengtson BP, Eaves FF 3rd.** High-resolution ultrasound in the detection of silicone gel breast implant shell failure: background, in vitro studies, and early clinical results. *Aesthet Surg J* 2012 Feb; 32(2): 157-74.
146. **Blount AL, Martin MD, Lineberry KD, et al.** Capsular contracture rate in a low-risk population after primary augmentation mammoplasty. *Aesthet Surg J* 2013 May; 33(4): 516-21.
147. **Bar-Meir E, Eherenfeld M, Shoenfeld Y.** Silicone gel breast implants and connective tissue disease. A comprehensive review. *Autoimmunity* 2003; 36: 193-7.
148. **Cunningham BL, Lokeh A, Gutowski KA.** Saline-filled breast implant safety and efficacy: a multicenter retrospective review. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 2143-9; discussion 2150-1.
149. **Kadziński L, Prokopowicz M, Jakóbkiewicz-Banecka J, et al.** Effect of Silicone on the Collagen Fibrillogenesis and Stability. *J Pharm Sci* 2015 April; 104(4): 1275–1281.
150. **Karlson EW, Hankinson SE, Liang MH, et al.** Association of silicone breast implants with immunologic abnormalities: a prospective study. *Am J Med* 1999; 106: 11-9.
151. **Pfau JC, Brown JM, Helian A.** Silica-exposed mice generate autoantibodies to apoptotic cells. *Toxicology* 2004; 195: 167-76.

152. **Perricone C, Colafrancesco S, Mazor RD, et al.** Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: Unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects. *J Autoimmun* 2013 Dec; 47:1-16.
153. **West, S.** *Rheumatology Secrets*, Elsevier 2014; 597.
154. **Black S, Kushner I, Samols D.** C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 487-90.
155. **Agencia española de medicamentos y productos sanitarios.** Actualización de la información y de las recomendaciones sobre prótesis mamarias "Poly Implant Prothèse (PIP)" [http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/productosSanitarios/seguridad/2013/NI-PS\\_18-2013-poly-implant.htm](http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/productosSanitarios/seguridad/2013/NI-PS_18-2013-poly-implant.htm).
156. **Bar-Meir E, Eherenfeld M, Shoenfeld Y.** Silicone gel breast implants and connective tissue disease. A comprehensive review. *Autoimmunity* 2003; 36: 193-7.
157. **Contant CM, Swaak AJ, Obdeijn AI, et al.** A prospective study on silicone breast implants and the silicone-related symptom complex. *Clin Rheumatol* 2002; 21: 215-9.
158. **Brunner CA, Feller AM, Groner R, et al.** Increase of immunologically relevant parameters in correlation with Baker classification in breast implant recipients. *Ann Plast Surg* 1996; 36: 512-18; discussion 518-21.