

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 941**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2012 PCT/EP2012/057919**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12146783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2012 E 12719655 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2702169**

54 Título: **Ácido nucleico mitocondrial como marcador para enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias**

30 Prioridad:

29.04.2011 EP 11164329

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.07.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (100.0%)
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**WALKER, ULRICH;
LEBRECHT, DIRK y
VENHOFF, NILS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 774 941 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico mitocondrial como marcador para enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias

La presente invención se refiere al diagnóstico de enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias, denominadas AID.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los neutrófilos polimorfonucleares reconocen estructuras conservadas en patógenos microbianos, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por medio de receptores tipo toll (TLRs), lo que los convierte en actores importantes en el sistema inmune innato¹. Entre los TLRs, la señalización de TLR9 se ha implicado en la patogénesis del lupus y otras enfermedades 'autoinmunes'^{2,3}. TLR9 se expresa exclusivamente en vesículas intracelulares y reconoce motivos de ADN de citosina-fosfatidil-guanina (CpG) no metilados que con frecuencia están presentes en bacterias y virus, pero son raros en células de mamíferos¹. La unión del ligando de TLR activa el factor de transcripción regulador factor nuclear KB e induce la secreción de citocinas proinflamatorias.

El trauma y otras formas de lesión celular pueden liberar patrones moleculares asociados al "daño" endógeno (DAMPs) que, de forma similar a los PAMPs microbianos, también activan la inmunidad innata⁴. Ante tal lesión, las células pueden liberar ADN mitocondrial (ADNmt) que contiene motivos CpG no metilados y se asemeja al ADN bacteriano¹. Se ha demostrado que el ADNmt en concentraciones clínicamente relevantes activa los neutrófilos polimorfonucleares humanos a través de TLR9, un proceso que promueve su desgranulación y provoca inflamación sistémica y lesiones orgánicas, incluyendo la lesión pulmonar inflamatoria⁴.

Un aspecto recientemente descubierto de la defensa antimicrobiana de los leucocitos polimorfonucleares es su capacidad para liberar cromatina en forma de fibras extracelulares denominadas trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)⁵⁻⁷. Se ha demostrado en eosinófilos que el proceso de formación de NET es un evento temprano de muerte celular denominado 'NETosis'. Los neutrófilos polimorfonucleares y los eosinófilos desempeñan un papel importante en la patogénesis de la vasculitis asociada a ANCA (AAV), tal como la granulomatosis de Wegener (WG), la poliangeítis microscópica (MPA) y el síndrome de Churg-Strauss (CSS). Estas formas de vasculitis se asocian con la presencia de anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) en el suero de los pacientes afectados⁸. Se ha demostrado que en WG, los ANCA se dirigen principalmente contra la proteinasa 3 (PR3), mientras que en la MPA los ANCA tienden a dirigirse contra la mieloperoxidasa. PR3-ANCA puede tener un papel patogénico directo en la patogénesis de WG activando neutrófilos cebados y también induciendo daño de células endoteliales⁸.

Recientemente se ha demostrado que la activación de las células endoteliales provoca la formación de NET, y que, a la inversa, las NETs pueden inducir lesiones en las células endoteliales⁹. De este modo, las NETs también pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la AAV. En este contexto, también es interesante observar que la propensión a las recaídas de la enfermedad en WG puede verse aumentada por infecciones bacterianas con *Staphylococcus aureus*¹⁰⁻¹², que también se sabe que desencadenan la formación de NET¹³. Finalmente, se ha demostrado que no solo los estímulos bacterianos, tal como *S. aureus*, sino también ANCA, pueden inducir NETosis¹⁴. De hecho, PR3 y mieloperoxidasa se han encontrado en asociación física con componentes de NET en los glomérulos de individuos con glomerulonefritis asociada a ANCA¹⁴.

Un problema de la presente descripción es proporcionar un marcador adecuado útil para apoyar o disminuir la probabilidad del diagnóstico de AID en situaciones clínicamente poco claras. Otro problema de la presente invención es proporcionar un marcador de actividad de la enfermedad que podría ser útil para determinar la intensidad de la terapia de dicho AID.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que los pacientes que padecen AID muestran niveles elevados de ADN mitocondrial que circula en plasma. Además, la relación de ADN mitocondrial a ADN nuclear fue elevada. Por lo tanto, la invención se refiere al diagnóstico de AID determinando la cantidad de ácidos nucleicos mitocondriales y/o la relación de ácidos nucleicos mitocondriales a nucleares, y a otros aspectos asociados con ellos.

45 Zhang et al. (2010) Nature 464, 104-108 describen experimentos que sugieren que los patrones moleculares asociados al "daño" mitocondrial circulante (DAMPs) causan respuestas inflamatorias a las lesiones. Zhang et al. no describen el diagnóstico de enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias (AID).

50 Khurana et al. (2008) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49, 3299-3304 investigan si el daño oxidativo del ADN mitocondrial ocurre tempranamente en la uveítis autoinmune experimental (EAU), antes de la infiltración de leucocitos. El daño al ADN mitocondrial y al ADN nuclear se evaluó utilizando una técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa larga. Khurana et al. no describen el diagnóstico de enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias (AID), ni sugieren que niveles elevados de ADN mitocondrial en plasma podrían ser indicativos de AID.

55 Yu et al. (2009) Genes and Immunity 10, 601-605 dan a conocer una asociación de cierto polimorfismo del gen mitocondrial (UCP2-866 G/A) con enfermedades inflamatorias crónicas. Yu et al. no determinan la cantidad o

concentración de ADN mitocondrial circulante en muestras de pacientes. Por el contrario, la descripción de Yu et al. se limita al genotipado del polimorfismo.

5 Feng et al. (2000) Chinese Medical Journal 113(8), 743-746 investigan las mutaciones primarias del ADN mitocondrial asociadas con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) en pacientes con neuropatía óptica. Feng et al. no determinan la cantidad o concentración de ADN mitocondrial circulante en muestras de pacientes. Por el contrario, Feng et al. detectan ciertas mutaciones en genes mitocondriales.

10 El documento WO 2007/106790 A2 describe métodos, composiciones y usos de los mismos, relacionados con el vitíligo o la enfermedad autoinmune/autoinflamatoria asociada al vitíligo (VAAAD). En realizaciones particulares, las variaciones genéticas en el gen NALP1 son útiles para detectar, diagnosticar, predecir el riesgo o tratar al menos uno de vitíligo o VAAAD. En realizaciones más particulares, la presencia de variaciones genéticas tales como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la región genética de NALP1 son útiles para detectar, diagnosticar o predecir el riesgo de VAAAD. En otras realizaciones, los inhibidores dirigidos contra NALP1, caspasa-1 o caspasa-5, ASC (PYCARD), interleucina-1ss, receptor de interleucina-1ss, o interleucina 18, pueden administrarse a un sujeto para tratar VAAAD. El gen NALP1 es un gen cromosómico y, por lo tanto, el documento WO 2007/106790 A2 no tiene como objetivo determinar la cantidad de ADN mitocondrial.

15 El documento EP 812922 A2 describe nuevos polimorfismos mitocondriales humanos, y sondas y cebadores para detectar los mismos. Se afirma que la detección de tales polimorfismos es útil en una variedad de campos tales como el análisis forense, la epidemiología y la medicina preventiva. Esta referencia no determina la cantidad o concentración de ADN mitocondrial circulante en muestras de pacientes. Más bien, la descripción del documento EP 812922 A2 et al. se limita al genotipado de los polimorfismos.

20 El documento EP 1538218 A1 describe métodos para diagnosticar o detectar afecciones o enfermedades inflamatorias, que incluyen enfermedad autoinflamatoria y trastorno afectivo, en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, analizando un marcador para una enfermedad inflamatoria. Se describe un método para diagnosticar o detectar una enfermedad inflamatoria en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar el nivel de diversos productos génicos específicos de inflamación en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, preferiblemente monocitos de sangre periférica, en el que dicho gen específico de la inflamación se selecciona del grupo que comprende HSPC228, 34703_f_at, MCP-3, CCL2, EMP1, CDC42, TLE3, SPRY2, p40BBP, HSPC060, NAB2, HSPA1A, HSPA1B, MAPRE2,OAS1, CCR2, CX3CR1, DOK1, HBB, G-gamma globina, THBD, PHLDA1, DTR y GNLV. El documento EP 1538218 A1 no enseña ni sugiere determinar la cantidad de ADN mitocondrial.

30 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad autoinmune o autoinflamatoria (AID), que comprende determinar la cantidad o concentración de ADN mitocondrial circulante (ADNmt) en una muestra de plasma de un individuo que padece la AID o se sospecha que padece la AID, y diagnosticar una AID si la concentración del ADNmt en el plasma es > 150.000 copias por ml de plasma del individuo, en el que dicha AID se selecciona del grupo que consiste en vasculitis asociada a ANCA, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de Crohn.

40 La presente invención se refiere a un método para monitorizar la progresión de una enfermedad autoinmune o autoinflamatoria (AID), que comprende determinar la cantidad o concentración de ADN mitocondrial circulante (ADNmt) en una muestra de plasma de un individuo que padece la AID o se sospecha que padece AID durante un período de tiempo, y diagnosticar una AID si la concentración del ADNmt en el plasma es > 150.000 copias por ml de plasma del individuo, en el que dicha AID se selecciona del grupo que consiste en vasculitis asociada a ANCA, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de Crohn.

DESCRIPCION DETALLADA

45 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar o monitorizar la progresión de una enfermedad autoinmune o autoinflamatoria.

Enfermedad autoinmune o autoinflamatoria

50 Las enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias (AID) son trastornos caracterizados por una respuesta aberrante del sistema inmune adquirido o innato, que da como resultado la destrucción de sus propias células o tejidos. Preferiblemente, la enfermedad a diagnosticar o monitorizar de acuerdo con la presente descripción son AID asociadas con, pero no restringidas a, inflamación sistémica, por ejemplo multiorgánica. En la presente solicitud, una AID se considera inflamatoria si muestra signos de inflamación, ya sea por un mayor nivel de proteína C reactiva (CRP) o un infiltrado anormal de células inflamatorias en los tejidos afectados en la histología o la citología en alguna etapa durante el transcurso de la enfermedad. En una realización particular, la AID es una AID sistémica. Una AID se considera sistémica si no solo concierne a órganos o tejidos específicos, sino que afecta a múltiples órganos o tejidos. En algunos casos, los efectos de la enfermedad pueden encontrarse ubicuamente en un organismo.

Preferiblemente, la AID a diagnosticar y/o monitorizar de acuerdo con esta descripción se selecciona del grupo que consiste en valculitis asociada a ANCA (AAV), enfermedades del tejido conjuntivo (lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, formas no diferenciadas y superpuestas), enfermedades inflamatorias del intestino (tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), artropatías cristalinas (tales como gota, pseudogota y enfermedad por depósito de hidroxapatita), diferentes formas de artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica y las espondiloartropatías), psoriasis y sarcoidosis, y síndrome de disneico del adulto (ARDS), así como la fiebre mediterránea familiar, síndromes autoinflamatorios de fiebre periódica (por ejemplo, síndromes de fiebre asociados a la criopirina, y otros), o la enfermedad de Still de comienzo en adultos. Otras AIDs incluyen todo tipo de inflamaciones de vasos grandes o medianos (vasculitis), por ejemplo arteritis de células gigantes (GCA), aortitis, enfermedad de Behcet, así como polimialgia reumática. La AAV puede ser granulomatosis de Wegener (WG), poliangeítis microscópica (MPA), síndrome de Churg-Strauss (CSS) o glomerulonefritis asociada a ANCA aislada. Otras AID en las que los ensayos de ANmt tienen utilidad diagnóstica según esta invención son todos los tipos de vasculitis de vasos grandes, por ejemplo arteritis de células gigantes (GCA), aortitis, enfermedad de Behcet, así como polimialgia reumática, y diferentes formas de artritis que involucran el esqueleto axial o articulaciones periféricas (tales como las espondiloartropatías, la artritis reumatoide y la artritis psoriásica). Finalmente, el síndrome disneico del adulto, la enfermedad psoriásica de la piel, la sarcoidosis, la fiebre mediterránea familiar, los síndromes autoinflamatorios de fiebre periódica (por ejemplo, los síndromes de fiebre asociados a la criopirina, y otros), la enfermedad Still de comienzo en adulto, también se consideran una AID en términos de nuestra invención.

Además, la AID puede ser AID activa o AID inactiva. Preferiblemente, la AID es AID activa, más preferiblemente la AID es AAV activa, una enfermedad activa del tejido conjuntivo (tal como SLE, esclerosis sistémica, miositis, síndrome de Sjögren, formas superpuestas o no diferenciadas), una artropatía cristalina activa (tal como gota, pseudogota o enfermedad por depósito de hidroxapatita), así como una enfermedad inflamatoria intestinal activa (tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn). Otra AID preferida según esta invención son formas activas de los siguientes trastornos: todos los tipos de inflamaciones de vasos grandes y medianos (vasculitis), por ejemplo arteritis de células gigantes (GCA), aortitis, enfermedad de Behcet, así como polimialgia reumática y artritis que implican esqueleto axial y/o articulaciones periféricas (tales como las espondiloartropatías, artritis reumatoide y artritis psoriásica); el síndrome disneico del adulto, enfermedad psoriásica de la piel, fiebre mediterránea familiar, síndromes autoinflamatorios de fiebre periódica (por ejemplo, los síndromes de fiebre asociados a la criopirina, y otros). La enfermedad de Still del adulto y la sarcoidosis también se pueden considerar como una AID.

Muestra

En una realización, el método de la invención comprende detectar ADNmt en la muestra. El término "muestra", como se usa en el presente documento, designa una composición que deriva del fluido corporal de un individuo. Los fluidos corporales incluyen sangre, orina, leche, líquido cefalorraquídeo, lavado bronquial libre de células, y similares. Las muestras preferidas son composiciones que comprenden sangre, plasma o suero obtenidas o derivadas del individuo. La muestra puede ser una composición que ha sido procesada para estar en una condición adecuada para el método de acuerdo con la invención. El procesamiento puede incluir centrifugación, absorción, inmunocaptura, extracción, precipitación, concentración, filtración, diálisis y/o dilución. El tipo de procesamiento puede depender de la técnica que se utiliza para detectar el ácido nucleico mitocondrial en la muestra. Por ejemplo, una muestra de sangre puede estar sujeta a centrifugación de modo que se obtenga plasma. En otra realización, la muestra puede diluirse antes del análisis. En aún otra realización, se extrae ADN o ARN de una muestra de sangre o plasma antes del análisis. En una realización preferida, una muestra de sangre obtenida del individuo se centrifuga primero para obtener plasma, y luego se extrae el ADN total de dicho plasma. La muestra obtenida de esta manera puede analizarse entonces adicionalmente.

En una realización, el método de la descripción comprende solo etapas que se llevan a cabo in vitro. En esa realización, la presente invención no abarca la etapa de obtener la muestra del cuerpo del individuo. En otra realización, la presente invención abarca la etapa de obtener la muestra del cuerpo del individuo.

Detectando ANmt

El ANmt a detectar puede ser ADN mitocondrial (ADNmt) o ARN mitocondrial (ARNmt). Preferiblemente, el ANmt es ADNmt. Preferiblemente, el ANmt a detectar es ANmt circulante. El ácido nucleico "circulante" es un ácido nucleico libre de células que se puede encontrar en un fluido corporal de un individuo, por ejemplo en sangre y/u orina.

La etapa de detectar ANmt en la muestra puede incluir determinar la presencia o ausencia de ANmt en la muestra de manera cualitativa. Preferiblemente, sin embargo, la etapa de detectar ANmt incluye determinar la cantidad o concentración de ANmt en la muestra de una manera cuantitativa o semicuantitativa. Lo más preferible, la etapa de detectar el ANmt incluye determinar la cantidad o concentración de ADNmt en la muestra de manera cuantitativa.

El método de la descripción comprende preferiblemente la detección del ANmt por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método de la descripción puede incluir ensayos de PCR, tales como PCR cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa o RT-PCR, que implica opcionalmente una coamplificación de una secuencia

mitocondrial y una secuencia de referencia, tal como una secuencia nuclear. El método de la descripción también puede incluir ensayos de hibridación, por ejemplo ensayos de hibridación de ARN o ADN, utilizando muestras de ADN o ARN mitocondriales y nucleares en secuencias mitocondriales y de referencia como sondas. El método de la descripción también puede incluir métodos de cuantificación que utilizan anticuerpos dirigidos contra secuencias de ANmt, colorantes u otros marcadores que se intercalan o absorben en ANmt o ADN o ARN nucleares. La información de dichos ensayos se puede evaluar para proporcionar una relación de ácido nucleico mitocondrial a ácido nucleico nuclear (ADNmt a ADN nuclear, o ARNmt a ARN nuclear) en las células o tejidos del individuo. El método puede comprender además detectar ácido nucleico nuclear (NAn), por ejemplo ADNn o ARNn, en la muestra. Preferiblemente, el método comprende determinar el número de copias de ADNmt en el individuo. Esto se puede hacer determinando la cantidad de ADNmt en la muestra y calculando el número de copias como se muestra en los ejemplos.

En realizaciones alternativas, el cambio de la concentración relativa de ácido nucleico mitocondrial (por ejemplo, ADNmt o ARNmt) durante un período de tiempo también puede determinarse para proporcionar información de diagnóstico. En realizaciones alternativas, la invención también proporciona protocolos que, por ejemplo, evitan la necesidad de determinar el número de copias de ADNmt *per se*, facilitando en cambio una determinación de la cantidad relativa de ácido nucleico mitocondrial, por ejemplo la cantidad relativa al ácido nucleico nuclear.

Los métodos de PCR cuantitativa se describen, por ejemplo, en los siguientes documentos, patente U.S. nº 6.180.349; patente U.S. nº 6.033.854; y patente U.S. nº 5.972.602; Song, J. et al. (2001) *Diabetes Care* 24:865-869. Una secuencia de ADN o ARN mitocondrial se puede escoger de cualquier secuencia de nucleótidos específica de mitocondrias, que incluye, pero no se limita a, ATP sintasa 6, nº de acceso de GenBank AF368271; ARNt-Leu, número de acceso de GenBank S49541; subunidad 5 de NADH deshidrogenasa (MTND5), número de acceso de GenBank AF339085; citocromo b, número de acceso de GenBank AF254896, o cualquier otra secuencia nucleotídica específica de mitocondrias adecuada. Una secuencia de ADN o ARN nuclear se puede escoger de cualquier secuencia, que incluye, pero no se limita a, una secuencia de GAPDH humana, una secuencia de ARNr 28S humana, una secuencia de beta-globina, o cualquier otra secuencia de ADN o ARN nuclear adecuada. Las sondas de amplificación pueden diseñarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001) or Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1994). Preferiblemente, el método comprende amplificar el ADN del gen ATP-6 mitocondrial. Opcionalmente, el método comprende además amplificar el ADN del gen GAPDH nuclear. Alternativamente, se pueden emplear técnicas de hibridación para determinar la presencia o cantidad de ANmt en la muestra. El experto conoce técnicas adecuadas que usan oligonucleótidos o polinucleótidos en condiciones restrictivas. Preferiblemente, los oligonucleótidos o polinucleótidos utilizados como sondas se hibridan específicamente con secuencias de ANmt (véase más arriba).

La presencia o cantidad de ANmt se puede determinar adicionalmente usando polipéptidos o ligandos de hidratos de carbono que reconocen específicamente el ANmt, por ejemplo ADNmt. Por ejemplo, los anticuerpos que reconocen el ADN hipometilado se pueden usar en ensayos inmunológicos que se conocen *per se*, tal como un ELISA. Alternativamente, TLR9 puede usarse en un ensayo de unión típico como polipéptido capaz de unirse al ADNmt.

En otras realizaciones, se puede usar una enzima que se dirige específicamente al ADN hipometilado. Por ejemplo, la enzima puede cortar específicamente el ADN hipometilado. En dichos sitios de "muesca" se podría adherir un marcador no radiactivo (por ejemplo, biotina) o un radiomarcador. Dicho marcador se puede cuantificar entonces.

En otra realización, el ANmt puede aislarse primero específicamente de un conjunto de diferentes ácidos nucleicos y contaminantes, por ejemplo mediante centrifugación con gradiente de densidad. En una segunda etapa, el ANmt puede cuantificarse con cualquier método de cuantificación de ácido nucleico inespecífico.

45 Diagnóstico

El método para diagnosticar una enfermedad autoinmune o autoinflamatoria (AID) puede comprender las siguientes etapas:

obtener y/o recolectar una muestra de un paciente;

50 detectar el ANmt circulante en la muestra del paciente, preferiblemente determinando la cantidad o concentración de ANmt circulante en la muestra;

comparar la cantidad o concentración de ANmt detectado en la muestra con una cantidad o concentración estándar de ANmt encontrada en individuos sanos (véase más abajo);

diagnosticar AID si la cantidad o concentración de ANmt detectada en la muestra del paciente es mayor que la cantidad o concentración estándar de ANmt encontrada en individuos sanos, y opcionalmente si se cumplen uno o más criterios establecidos de AID, véase más abajo.

La cantidad promedio de ADNmt en el plasma de individuos sanos es alrededor de 10.000 a alrededor de 32.000 copias por ml de plasma. La cantidad promedio de ADNmt en individuos afectados por una AID generalmente es alrededor de 250.000 a alrededor de 1.200.000 copias por ml de plasma.

5 En un aspecto de la descripción, la detección de un nivel elevado de ADNmt en la muestra del individuo con relación a las muestras de control aumenta la probabilidad de la presencia de la AID en una población dada. En otro aspecto importante de la invención, la detección de niveles normales de ADNmt reduce la probabilidad de la presencia de una AID en una población dada, o incluso excluye el diagnóstico. Del mismo modo, el grado de elevación del ADNmt en la muestra del individuo con relación a las muestras de control puede correlacionarse con la actividad de la AID en el individuo.

10 Las muestras de control se han obtenido de individuos que no padecen AID u otras causas de inflamación sistémica, preferiblemente de individuos sanos. Las concentraciones de ADNmt en el plasma > 50.000 copias por ml de plasma se asocian típicamente con la presencia de AID. En consecuencia, el individuo puede ser más propenso a sufrir la AID o tener la AID o verse afectado por la AID si la cantidad de ADNmt en el plasma del individuo es mayor que 30.000 copias por ml de plasma, preferiblemente si la cantidad de ADNmt en el plasma del individuo es mayor que 15
15 50.000 copias por ml de plasma, más preferiblemente si la cantidad de ADNmt en el plasma del individuo es mayor que 150.000 copias por ml de plasma. Por el contrario, una AID activa puede descartarse con alta confianza en un individuo con 15.000 o menos copias de ADNmt por ml de plasma.

20 En otra realización, se puede diagnosticar que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que se ve afectado por la AID si la cantidad de ADNmt en el plasma del individuo excede el número de la mediana de copias de ADNmt en plasma de control de individuos sanos en al menos 50%, preferiblemente en al menos 100%, más preferiblemente en al menos 200%, aún más preferiblemente en al menos 500%, lo más preferible en al menos 1.000%.

En todavía otra realización, se puede diagnosticar que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que está afectado por la AID si la relación de ADNmt/ADNn en el plasma del individuo es mayor que 5, preferiblemente mayor que 10, más preferiblemente mayor que 20, lo más preferible mayor que 30.

25 En todavía otra realización, se puede diagnosticar que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que se ve afectado por la AID si la relación ADNmt/ADNn en el plasma del individuo excede la relación de la mediana ADNmt/ADNn en individuos de control en al menos 100%, preferiblemente en al menos 200%, más preferiblemente en al menos 300%, lo más preferible en al menos 500%.

30 En realizaciones particulares, se diagnostica que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que se ve afectado por la AID si se satisface o satisfacen (1) cualquiera de los criterios anteriores relacionados con el ANmt, y (2) uno o más de los criterios establecidos para el diagnóstico y/o clasificación de la AID respectiva. Se puede diagnosticar que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que se ve afectado por la AID si se satisface (1) cualquiera de los criterios anteriores relacionados con el ANmt, y (2) al menos uno de los criterios establecidos para el diagnóstico y/o la clasificación de la AID respectiva. En otra realización, se diagnostica que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que está afectado por la AID si se satisfacen (1) cualquiera de los criterios anteriores relacionados con el ANmt, y (2) dos o más de los criterios establecidos para el diagnóstico y/o clasificación de la AID respectiva. En todavía otra realización, se diagnostica que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que está afectado por la AID si se satisfacen (1) cualquiera de los criterios anteriores relacionados con el ANmt, y (2) tres o más de los criterios establecidos para el diagnóstico y/o clasificación de la AID respectiva. En todavía otra realización, se diagnostica que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que está afectado por la AID si se satisfacen (1) cualquiera de los criterios anteriores relacionados con el ANmt, y (2) cuatro o más de los criterios establecidos para el diagnóstico y/o clasificación de la AID respectiva. En todavía otra realización, se diagnostica que el individuo padece la AID o que tiene la AID o que está afectado por la AID si se satisfacen (1) cualquiera de los criterios anteriores relacionados con el ANmt, y (2) cinco o más (por ejemplo, seis, siete, ocho, nueve o diez) de los criterios establecidos para el diagnóstico y/o clasificación de la AID respectiva.
40
45

Los criterios establecidos para el diagnóstico y/o clasificación de AID dependen de qué AID específica se trate. A continuación resumimos los criterios establecidos hasta ahora para varias AIDs (1 a 19):

1. Criterios de clasificación revisados en 1987 por el American College of Rheumatology para la artritis reumatoide

| Criterio | Descripción |
|---------------------------------------|--|
| Rigidez matutina | Rigidez matutina en y alrededor de las articulaciones, que dura al menos una hora antes de la mejoría máxima. |
| Artritis de 3 o más áreas articulares | Al menos 3 áreas articulares (de 14 áreas posibles; articulaciones PIP derecha o izquierda, MCP, de muñeca, codo, rodilla, tobillo, MTP) simultáneamente han tenido inflamación de tejidos blandos o líquido (no |

| | |
|--|--|
| | sobrecrecimiento óseo solo) según lo observado por un médico. |
| Artritis de las articulaciones de las manos | Al menos un área hinchada (como se definió anteriormente) en una articulación de muñeca, MCP o PIP. |
| Artritis simétrica | Afectación simultánea de las mismas áreas articulares (como se definió anteriormente) en ambos lados del cuerpo (es aceptable la implicación bilateral de PIPs, MCPs, o MTPs, sin simetría absoluta). |
| Nódulos reumatoideos | Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas o superficies extensoras, o en regiones yuxtaarticulares según lo observado por un médico. |
| Factor reumatoide sérico | Demostración de cantidades anormales de factor reumatoide sérico mediante cualquier método para el cual el resultado ha sido positivo en menos del 5 por ciento de los sujetos de control normales. |
| Cambios radiográficos | Cambios radiográficos típicos de la artritis reumatoide en radiografías posteroanteriores de mano o muñeca, que deben incluir erosiones o descalcificación ósea inequívoca localizada en, o más marcada adyacente a, las articulaciones involucradas (los cambios de osteoartritis por sí solos no califican). |
| Nota: Para fines de clasificación, un paciente tiene AR si se cumplen al menos cuatro de estos criterios (los primeros cuatro deben haber estado presentes durante al menos seis semanas). | |

Referencia:

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31(3):315.

5

2. Los criterios de clasificación de ACR-EULAR de 2010 para artritis reumatoide

| | |
|---|------------|
| Población diana (¿Quién debe hacerse la prueba?): pacientes que tienen al menos 1 articulación con sinovitis clínica definida (hinchazón) *, con la sinovitis no explicada mejor por otra enfermedad | Puntuación |
| Criterios de clasificación para la AR (algoritmo basado en puntuación: añade puntuación de las categorías A-D; es necesaria una puntuación de $\geq 6/10$ para clasificar a un paciente con AR definida)† | |
| A. Implicación de la articulación § | |
| 1 articulación grande ¶ | 0 |
| 2-10 articulaciones grandes | 1 |
| 1-3 articulaciones pequeñas (con o sin implicación de articulaciones grandes) # | 2 |
| 4-10 articulaciones pequeñas (con o sin implicación de articulaciones grandes) | 3 |
| > 10 articulaciones (al menos 1 articulación pequeña) ** | 5 |
| B. Serología (se necesita al menos 1 resultado de ensayo para la clasificación) †† | |
| RF negativo y ACPA negativo | 0 |
| RF positivo bajo o ACPA positivo bajo | 2 |
| RF positivo alto o ACPA positivo alto | 3 |

| | |
|--|-------------------|
| <p>C. Agentes reaccionantes de fase aguda (se necesita al menos 1 resultado de ensayo para la clasificación) ‡‡</p> <p>CRP normal y ESR normal</p> <p>CRP anormal o ESR anormal</p> | <p>0</p> <p>1</p> |
| <p>D. Duración de síntomas §§</p> <p><6 semanas</p> <p>≥6 semanas</p> | <p>0</p> <p>1</p> |
| <p>* Los criterios están dirigidos a la clasificación de los pacientes que se presentan recientemente. Además, los pacientes con enfermedad erosiva típica de la artritis reumatoide (AR) con antecedentes compatibles con el cumplimiento previo de los criterios de 2010 deben clasificarse como que tienen AR. Los pacientes con enfermedad de larga duración, incluyendo aquellos cuya enfermedad es inactiva (con o sin tratamiento) que, según los datos disponibles retrospectivamente, han cumplido previamente los criterios de 2010, deben clasificarse como que tienen AR.</p> <p>‡ Aunque los pacientes con una puntuación de <6/10 no se pueden clasificar como que tienen AR, su estado puede ser reevaluado, y los criterios pueden cumplirse acumulativamente con el tiempo.</p> <p>§ La implicación articular se refiere a cualquier articulación <i>tumefacta</i> o <i>blanda</i> en el examen, que puede confirmarse mediante pruebas de imagen de sinovitis. Las articulaciones interfalángicas distales, las primeras articulaciones carpometacarpianas, y las primeras articulaciones metatarsofalángicas se excluyen de la evaluación. Las categorías de distribución articular se clasifican según la ubicación y el número de articulaciones involucradas, con la colocación en la categoría más alta posible en base al patrón de la implicación articular.</p> <p>¶ “Articulaciones grandes” se refiere a hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos.</p> <p># “Articulaciones pequeñas” se refiere a las articulaciones metacarpofalángicas, articulaciones interfalángicas proximales, articulaciones metatarsofalángicas segunda a quinta, articulaciones interfalángicas del pulgar, y muñecas.</p> <p>** En esta categoría, al menos 1 de las articulaciones involucradas debe ser una articulación pequeña; las otras articulaciones pueden incluir cualquier combinación de articulaciones grandes y pequeñas adicionales, así como otras articulaciones que no se enumeran específicamente en otro lugar (por ejemplo, temporomandibular, acromioclavicular, esternoclavicular, etc.).</p> <p>†† Negativo se refiere a valores de UI que son menores o iguales al límite superior de lo normal (ULN) para el laboratorio y el ensayo; positivo bajo se refiere a valores de UI que son más altos que el ULN pero ≤3 veces el ULN para el laboratorio y el ensayo; positivo alto se refiere a valores de UI que son >3 veces el ULN para el laboratorio y el ensayo. Cuando la información del factor reumatoide (RF) solo está disponible como positiva o negativa, un resultado positivo debe puntuarse como positivo bajo para RF. ACPA = anticuerpo anti-proteína citrulinada.</p> <p>‡‡ Normal/anormal está determinado por los estándares de laboratorio locales. CRP = proteína C reactiva; ESR = velocidad de sedimentación globular.</p> <p>§§ La duración de los síntomas se refiere al autoinforme del paciente de la duración de los signos o síntomas de sinovitis (por ejemplo, dolor, hinchazón, sensibilidad) de las articulaciones que están clínicamente involucradas en el momento de la evaluación, independientemente del estado del tratamiento.</p> | |

Referencias:

5 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(9):1580.

10 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid

arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2010; 62(9):2569.

3. Criterios de clasificación artritis psoriasis (CASPAR Study Group 2006)

Presencia de inflamación musculoesquelética (una artritis inflamatoria, entesitis, o dolor de espalda);

5 MÁS tres puntos de los siguientes:

- psoriasis cutánea (presente) (dos puntos), previamente presente por antecedentes (un punto), o antecedentes familiares de psoriasis (un punto) si el paciente no está afectado
- Lesiones de las uñas (onicólisis, picaduras) - un punto
- Dactilitis (presente o pasada, documentada por un reumatólogo) - un punto

10

- Factor reumatoide negativo - un punto
- Formación de hueso yuxtaarticular en radiografías (distinto de osteofitos) - un punto

Referencia:

Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. Arthritis Rheum. 2006;54(8):2665.

15 4. Criterios de ACR para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (1982)

| Criterios | Definición |
|---------------------------|--|
| 1. Erupción malar | Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares, que tiende a evitar los pliegues nasolabiales |
| 2. Erupción discoide | Parches eritematosos elevados con escamas queratóticas adherentes y taponamiento folicular; la cicatrización atrófica puede ocurrir en lesiones más antiguas |
| 3. Fotosensibilidad | Erupción cutánea como resultado de una reacción inusual a la luz solar, según el historial del paciente o la observación del médico |
| 4. Úlceras orales | Ulceración oral o nasofaríngea, generalmente indolora, observada por un médico |
| 5. Artritis | Artritis no erosiva que implica 2 o más articulaciones periféricas, caracterizada por sensibilidad, tumefacción, o derrame |
| 6. Serositis | Pleuritis - antecedentes convincentes de dolor pleurítico o roce escuchados por un médico o evidencia de derrame pleural O |
| | Pericarditis - documentada por EKG, roce o evidencia de derrame pericárdico |
| 7. Trastorno renal | Proteinuria persistente mayor de 0,5 gramos por día o mayor de 3+ si no se realiza la cuantificación, O |
| | Moldes celulares - pueden ser glóbulos rojos, hemoglobina, granulares, tubulares, o mixtos |
| 8. Trastorno neurológico | Convulsiones O psicosis: en ausencia de fármacos causales o trastornos metabólicos conocidos (uremia, cetoacidosis o desequilibrio electrolítico) |
| 9. Trastorno hematológico | Anemia hemolítica - con reticulocitosis, O |
| | Leucopenia - menos de 4.000/mm ³ en total en dos o |

| | |
|------------------------------|---|
| | más ocasiones, O |
| | Linfopenia hematológica - menos de 1.500/mm ³ en dos o más ocasiones, O |
| | Trombocitopenia - menos de 100.000/mm ³ en ausencia de fármacos causales |
| 10. Trastornos inmunológicos | Anticuerpo antifosfolípido positivo, O |
| | Anti-ADN - anticuerpo contra el ADN nativo en título anormal, O |
| | Anti-Sm - presencia de anticuerpo contra el antígeno nuclear Sm, O |
| | Ensayo serológico falso positivo para sífilis que se sabe que es positivo durante al menos seis meses y confirmado por la inmovilización de <i>Treponema pallidum</i> o ensayo de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes |
| 11. Anticuerpo antinuclear | Un título anormal de anticuerpo antinuclear por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en cualquier momento y en ausencia de fármacos que se sabe que están asociados con el síndrome de "lupus inducido por fármacos" |

La clasificación propuesta se basa en 11 criterios. Con el fin de identificar pacientes en estudios clínicos, se debe afirmar que una persona tiene lupus eritematoso sistémico si hay 4 o más de los 11 criterios, en serie o simultáneamente, durante cualquier intervalo de observación.

5 Referencia:

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25(11):1271.

5. Los criterios de la American College of Rheumatology de 1990 para la clasificación de la granulomatosis de Wegener

| Criterio | Definición |
|--------------------------------------|---|
| Inflamación nasal u oral | Desarrollo de úlceras orales dolorosas o indoloras o secreción nasal purulenta o con sangre |
| Radiografía de tórax anormal | Radiografía de tórax que muestra la presencia de nódulos, infiltrados fijos, o cavidades |
| Sedimento urinario | Microhematuria (> 5 glóbulos rojos por campo de alta potencia) o moldes de glóbulos rojos en sedimento urinario |
| Inflamación granulomatosa en biopsia | Cambios histológicos que muestran inflamación granulomatosa dentro de la pared de una arteria o en el área perivascular o extravascular (arteria o arteriola) |

10

La presencia de dos o más de estos cuatro criterios arrojó una sensibilidad del 88 por ciento y una especificidad del 92 por ciento.

Referencia:

15 Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabrese LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RW Jr. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33(8):1101.

6. Criterios de clasificación de ACR de síndrome de Churg-Strauss (1990)

| Criterios y definiciones usados para la clasificación del síndrome de Churg-Strauss | |
|--|---|
| Asma | Historia de sibilancias o estertores difusos agudos al vencimiento y |
| Eosinofilia | Eosinofilia >10% en el recuento diferencial de glóbulos blancos |
| Historia de alergia* | Historia de alergia estacional (por ejemplo, rinitis alérgica) u otras alergias documentadas, incluyendo alimentos, contactantes y otros, excepto para alergia a medicamentos |
| Mononeuropatía o polineuropatía | Desarrollo de mononeuropatía, mononeuropatías múltiples, o polineuropatía (es decir, distribución de guantes y medias) atribuible a una vasculitis sistémica |
| Infiltrados pulmonares, no fijos | Infiltrados pulmonares migratorios o transitorios en radiografías (sin incluir infiltrados fijos), atribuibles a una vasculitis sistémica |
| Anomalía del seno paranasal | Antecedentes de dolor de seno paranasal agudo o crónico o sensibilidad u opacificación radiográfica de los senos paranasales |
| Eosinófilos extravasculares | Biopsia que incluye arteria, arteriola o vénula, que muestra acumulaciones de eosinófilos en áreas extravasculares |
| * Los antecedentes de alergias, aparte del asma o aquellas relacionadas con fármacos, se incluyen solo en el conjunto de criterios de clasificación de árbol y no en el conjunto de criterios de formato tradicional, que requiere 4 o más de los 6 otros apartados enumerados aquí. | |

Referencia:

- 5 Masi AT, Hunder GG, Lie JT, Michel BA, Bloch DA, Arend WP, Calabrese LH, Edworthy SM, Fauci AS, Leavitt RY. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis). *Arthritis Rheum.* 1990; 33(8):1094.

7. Poliangeítis microscópica

Sin criterios de clasificación

> Conferencia de Consenso de Chapel Hill sobre la Nomenclatura de la Vasculitis Sistémica

- 10 Nombres y definiciones de vasculitis adoptados por la Conferencia de Consenso de Chapel Hill sobre la Nomenclatura de la Vasculitis Sistémica*

| | |
|--|---|
| Vasculitis de vasos grandes Arteritis de células gigantes (temporal) | Arteritis granulomatosa de la aorta y sus ramas principales, con predilección por las ramas extracraneales de la arteria carótida. A menudo implica la arteria temporal. Por lo general, ocurre en pacientes mayores de 50 años y a menudo se asocia con polimialgia reumática. |
| Arteritis de Takayasu | Inflamación granulomatosa de la aorta y sus ramas principales. Suele aparecer en pacientes menores de 50 años. |
| Vasculitis de vasos de tamaño medio Poliarteritis nodosa (poliarteritis nodosa clásica) | Inflamación necrosante de arterias medianas o pequeñas sin glomerulonefritis o vasculitis en arteriolas, capilares, o vénulas. |
| Enfermedad de Kawasaki | Arteritis que implica arterias grandes, medianas y pequeñas, y asociada con el síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos. A menudo, están implicadas las arterias coronarias. La aorta y las venas pueden estar involucradas. Suele ocurrir en niños. |

| | |
|---|--|
| Vasculitis de vasos pequeños | |
| Granulomatosis de Wegener ‡ | Inflamación granulomatosa que afecta a las vías respiratorias, y vasculitis necrotizante que afecta a los vasos pequeños a medianos (por ejemplo, capilares, vénulas, arteriolas, y arterias). La glomerulonefritis necrotizante es común. |
| Síndrome de Churg-Strauss ‡ | Inflamación granulomatosa y rica en eosinófilos que afecta a las vías respiratorias, y vasculitis necrotizante que afecta vasos de tamaño pequeño a mediano, y se asocia con asma y eosinofilia. |
| Poliangeítis microscópica † (poliarteritis microscópica) ‡ | Vasculitis necrotizante, con pocos o ningún depósito inmune, que afecta los vasos pequeños (es decir, capilares, vénulas, o arteriolas). Puede estar presente una arteritis necrotizante que implica arterias pequeñas y medianas. La glomerulonefritis necrotizante es muy común. A menudo se produce capilaritis pulmonar. |
| Púrpura de Henoch-Schonlein | Vasculitis, con depósitos inmunes dominantes de IgA, que afecta a los vasos pequeños (es decir, capilares, vénulas, o arteriolas). Típicamente implica piel, intestino y glomérulos, y está asociada con artralgias o artritis. |
| Vasculitis crioglobulinémica esencial | Vasculitis, con depósitos inmunes de crioglobulina, que afecta a los vasos pequeños (es decir, capilares, vénulas, o arteriolas), y se asocia con crioglobulinas en el suero. La piel y los glomérulos a menudo están implicados. |
| Angeítis leucocitoclástica cutánea | Angeítis leucocitoclástica cutánea aislada sin vasculitis sistémica o glomerulonefritis. |
| <p>* El vaso grande se refiere a la aorta y las ramas más grandes dirigidas hacia las principales regiones del cuerpo (por ejemplo, las extremidades y la cabeza y el cuello); vaso de tamaño mediano se refiere a las principales arterias viscerales (por ejemplo, arterias renal, hepática, coronaria, y mesentérica); vaso pequeño se refiere a vénulas, capilares, arteriolas, y los radicales arteriales distales intraparenquimatosos que se conectan con las arteriolas. Algunas vasculitis de vasos pequeños y grandes pueden implicar arterias de tamaño mediano, pero las vasculitis de vasos grandes y medianos no implican vasos más pequeños que las arterias. Los componentes esenciales están representados por tipo normal; el tipo en cursiva representa componentes habituales, pero no esenciales. † Término preferido. ‡ Fuertemente asociado con autoanticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos.</p> | |

Referencia:

Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* 1994; 37(2):187.

- 5 8. Criterios de diagnóstico para la enfermedad de Behcet, Grupo de Estudio Internacional para la Enfermedad de Behcet 1990

| Criterio | Características requeridas |
|-----------------------------------|--|
| Ulceración oral recurrente | Ulceración aftosa menor, aftosa mayor, o herpetiforme, observada por un médico o paciente, que se repitió al menos 3 veces en un período de 12 meses |
| <i>Más dos de los siguientes:</i> | |
| Ulceración genital recurrente | Ulceración o cicatrización aftosa, observada por el médico o paciente |
| Lesiones oculares | Uveítis anterior, uveítis posterior, o células en vítreo en el examen con lámpara de hendidura; o vasculitis retiniana observada por un oftalmólogo |

| | |
|-----------------------------|---|
| Lesiones cutáneas | Eritema nudoso observado por un médico o paciente, pseudofoliculitis, o lesiones papulopustulares; o nódulos acneiformes observados por el médico en pacientes postadolescentes que no reciben tratamiento con corticosteroides |
| Ensayo de patergia positivo | Leído por el médico a las 24-48 h. |

Resultados aplicables solo en ausencia de otras explicaciones clínicas.

Referencia:

Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease. Lancet. 1990; 335(8697):1078.

5 9. Sarcoidosis

No existe un ensayo de diagnóstico definitivo para la sarcoidosis. El diagnóstico de sarcoidosis requiere tres elementos:

- Manifestaciones clínicas y radiográficas compatibles
- Exclusión de otras enfermedades que puedan presentar similitud
- 10 • Detección histopatológica similar de granulomas no caseificantes

Referencia:

Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160:736

15 10. Colitis ulcerosa

20 "El diagnóstico de colitis ulcerosa generalmente se puede establecer mediante los antecedentes característicos junto con un aspecto endoscópico típico de la mucosa y la histología confirmatoria observada en la biopsia de colon. La tomografía computarizada también puede mostrar un marcado engrosamiento de la pared intestinal, pero este hallazgo no es específico. Una pista histórica útil es la presencia de colitis ulcerosa en familiares de primer grado". (UpToDate 19.1)

11. Enfermedad de Crohn

25 "El diagnóstico de la enfermedad de Crohn generalmente se establece con hallazgos endoscópicos o estudios de imágenes en un paciente con antecedentes clínicos compatibles. El examen físico puede ser normal o mostrar signos inespecíficos (palidez, pérdida de peso) que sugieren de enfermedad de Crohn. Los hallazgos más específicos incluyen marcas de piel perianal, tractos sinusales y sensibilidad abdominal. La presentación de síntomas con frecuencia determina el orden de los ensayos posteriores. La colonoscopia es la prueba inicial más apropiada para pacientes que presentan diarrea predominante, mientras que los estudios de imágenes pueden ser más apropiados para aquellos que presentan dolor abdominal". (UpToDate 19.1)

12. Criterios preliminares de ARA para la clasificación de la esclerosis sistémica (esclerodermia)

| Criterio | Definición |
|---|---|
| criterio principal | esclerodermia proximal |
| <i>o dos o más de los siguientes:</i> | |
| criterios menores | 1) esclerodactilia 2) cicatrices digitales de las puntas de los dedos o pérdida de sustancia de la almohadilla distal del dedo 3) fibrosis pulmonar basilar bilateral |
| Los criterios propuestos tenían una sensibilidad del 97% para la esclerosis sistémica definitiva y una especificidad del 98%. | |

Glosario de términos clínicos utilizados en la descripción o clasificación de la esclerosis sistémica.

1. Cambios típicos de la piel esclerodermatosa: tirantez, engrosamiento e induración sin picaduras, excluyendo las formas localizadas de esclerodermia (esclerodermia morfea o lineal)
 - 5 a. Esclerodactilia: cambios indicados anteriormente limitados a (dedos de manos y pies)
 - b. Esclerodermia proximal: cambios indicados anteriormente proximales a las articulaciones metacarpofalángicas o metatarsfalángicas, que afectan a otras partes de las extremidades, cara, cuello o tronco (tórax o abdomen); generalmente bilateral, simétrica y casi siempre incluyendo esclerodactilia
- 10 2. Otras manifestaciones cutáneas atribuibles a esclerosis sistémica o trastornos de comparación
 - 15 a. Cicatrices de picadura digital o pérdida de sustancia de la almohadilla del dedo: áreas deprimidas en las puntas de los dedos o pérdida de tejido de la almohadilla digital como resultado de isquemia digital en lugar de trauma o causas exógenas
 - b. Edema bilateral de dedos o manos: edema firme pero con picaduras, especialmente en los dedos (incluye tumefacción hinchada similar a salchichas de los dedos) o el aspecto dorsal de las manos
 - c. Pigmentación anormal de la piel: hiperpigmentación que a menudo contiene áreas de hipopigmentación o despigmentación puntiforme o irregular (“pimienta y sal”)
 - 20 d. Fenómeno de Raynaud: al menos un cambio de color en dos fases en los dedos de las manos y a menudo en los pies, que consiste en palidez, cianosis y/o hiperemia reactiva en respuesta a la exposición al frío o la emoción, según lo determinado por los antecedentes del paciente o la observación del médico
3. Manifestaciones viscerales
 - 25 a. Fibrosis pulmonar bibasilar: patrón reticular bilateral de densidades lineales o lineonodulares que son más pronunciadas en las porciones basales de los pulmones en la radiografía torácica estándar; puede asumir la apariencia de moteado difuso o “pulmón en forma de panal”, y no debe ser atribuible a la enfermedad pulmonar primaria
 - b. Disfagia esofágica inferior (distal): malestar subesternal al tragar o sensación de atraco de alimentos en la ubicación retroesternal
 - 30 c. Dismotilidad esofágica inferior (distal): hipoperistalsis o aperistalsis, según lo demostrado por cine esofagrama o fluoroscopia o por estudio manométrico, a menudo acompañado de signos de disminución en el tono del esfínter esofágico inferior con reflujo de contenido gástrico hacia el esófago
 - d. Saculaciones del colon: divertículos de colon de boca ancha ubicados a lo largo del borde antimesentérico; encontradas en el examen de enema de bario; estas saculaciones también pueden ocurrir en íleon y yeyuno
- 35 Referencia:

Masi AT, et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum. 1980 May;23(5):581-90.
13. Criterios para la clasificación de la artritis aguda de gota primaria
 - 40 1. Microcristales de monohidrato de urato monosódico en el líquido articular durante el ataque
 2. Más de un ataque de artritis aguda
 3. Máxima inflamación desarrollada dentro de 1 día
 4. Ataque de monoartritis
 5. Enrojecimiento observado sobre las articulaciones
 - 45 6. Primera articulación metatarsfalángica dolorosa o inflamada

7. Primer ataque articular metatarsfalángico unilateral
8. Ataque articular tarsal unilateral
9. Tofo (probado o sospechoso)
10. Hiperuricemia
- 5 11. Hinchazón asimétrica dentro de una articulación en rayos X
12. Quistes subcorticales sin erosiones en rayos X
13. Cultivo de fluido articular negativo para organismos durante el ataque

La combinación de cristales, tofos, y/o 6 o más criterios es altamente sugerente de gota.

Referencia:

- 10 Wallace SL, Robinson H, Masi AT, Decker JL, McCarty DJ, Yü TF. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum.* 1977 Apr; 20(3):895-900.

14. "Criterios de diagnóstico y clasificación diagnóstica para la enfermedad por depósito de cristales de dihidrato de pirofosfato de calcio (CPPD)

Un diagnóstico definitivo de enfermedad por depósito de cristales de CPPD requiere:

- 15
- La demostración de cristales de CPPD en tejido o líquido sinovial por medios definitivos (por ejemplo, difracción de rayos X, etc.), O
 - La presencia de tanto cristales positivamente (pero débilmente) birrefringentes por microscopía de luz polarizada compensada como calcificación típica de cartílago o cápsula articular en el examen de rayos X

20 En la práctica clínica actual, la demostración definitiva de cristales mediante el patrón de difracción de rayos X en polvo, el análisis químico, o la microscopía de fuerza atómica rara vez se logra, excepto en centros especializados de investigación. De este modo, el diagnóstico se establece más comúnmente mediante el cumplimiento de la combinación de criterios radiográficos y de análisis del líquido sinovial.

Un diagnóstico probable de enfermedad por depósito de cristales de CPPD ocurre con:

- 25
- La identificación de cristales positivamente (pero débilmente) birrefringentes mediante microscopía de luz polarizada compensada, O
 - La presencia de calcificación típica de cartílago o cápsula articular en el examen radiográfico.

30 La mayoría de los pacientes que los reumatólogos consideran que tienen enfermedad por depósito de cristales de CPPD probablemente pertenezcan a la categoría de enfermedad probable. Dado el estado actual de manejo de este trastorno, este hecho no parece ser un dilema diagnóstico grave si las posibilidades diagnósticas alternativas se consideran cuidadosamente y se actúa adecuadamente.

El cumplimiento de cualquiera de los siguientes criterios debe levantar la sospecha de una posible enfermedad por depósito de cristales de CPPD e impulsar una evaluación directa dirigida a cumplir criterios específicos para el trastorno:

- 35
- artritis aguda de articulaciones grandes, especialmente las rodillas, O
 - artritis crónica que se asemeja a la osteoartritis, particularmente si las articulaciones afectadas no son típicas de la osteoartritis (muñecas, articulaciones MCP, codos y hombros) y si se acompañan de ataques agudos y autolimitados. Como se mencionó anteriormente, la distinción de la osteoartritis se sugiere además por las características radiográficas típicas de la artropatía por CPPD en articulaciones individuales y la columna vertebral (incluso en ausencia de condrocalcinosis); degeneración articular severa y progresiva,

40 especialmente con formación prominente de quistes subcondrales; y calcificaciones tendinosas aparentes en las radiografías.

Los criterios para una posible enfermedad por depósito de cristales de CPPD tienen como objetivo llamar la atención sobre la posibilidad del trastorno y estimular la búsqueda de criterios más definitivos. No están destinados a adjuntar un marcador de diagnóstico a un paciente individual. "UpToDate 19.1

45

Referencias:

Rosenthal, AK, Ryan, LM, McCarty, DJ. Calcium pyrophosphate crystal deposition disease, pseudogout, and articular chondrocalcinosis. In: Arthritis and Allied Conditions, 15^a ed, Koopman, WJ, Moreland, LW (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005, p. 2373.

- 5 Rosenthal, AK. Pseudogout: presentation, natural history, and associated conditions. In: Crystal-induced Arthropathies. Gout, Pseudogout and Apatite-associated Syndromes, Wortmann, RL, Schumacher, HR Jr, Becker, MA, Ryan, LM (Eds), Taylor & Francis Group, New York, 2006. p. 99.

15. Los criterios de la American College of Rheumatology 1990 para la clasificación de arteritis de células gigantes.

| Criterio | Definición |
|---|--|
| 1. Edad al inicio de la enfermedad \geq 50 años | Desarrollo de síntomas o hallazgos a partir de los 50 años de edad o más |
| 2. Nuevo dolor de cabeza | Nuevo inicio o nuevo tipo de dolor localizado en la cabeza |
| 3. Anomalía de la arteria temporal | Sensibilidad de la arteria temporal a la palpación o disminución de la pulsación, no relacionada con la arteriosclerosis de las arterias cervicales |
| 4. Velocidad de sedimentación globular elevada | Velocidad de sedimentación globular \geq 50 mm/hora por el método Westergren |
| 5. Biopsia de arteria anormal | Muestra de biopsia con arteria que muestra vasculitis caracterizada por un predominio de infiltración de células mononucleares o inflamación granulomatosa, generalmente con células gigantes multinucleadas |
| * Para fines de clasificación, se debe afirmar que un paciente tiene arteritis de células gigantes (temporal) si al menos 3 de estos 5 criterios están presentes. La presencia de 3 o más criterios produce una sensibilidad del 93,5% y una especificidad del 91,2%. | |

- 10 Referencia:

Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, Edworthy SM, Fauci AS, Leavitt RY, Lie JT, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. Arthritis Rheum. 1990 Aug; 33(8):1122-8.

16. Criterios para la polimialgia reumática (PMR).

| |
|--|
| Criterio |
| Dolor de hombro y/o rigidez bilateral |
| Inicio de la enfermedad de <2 semanas de duración |
| ESR inicial >40 mm/h |
| Duración de la rigidez matutina >1 h |
| Edad >65 años |
| Depresión y/o pérdida de peso |
| Sensibilidad en la parte superior del brazo bilateralmente |

- 15

Se puede considerar que un paciente tiene PMR probable si se cumplen 3 o más de estos criterios, o si al menos 1 criterio coexiste con una anomalía clínica o patológica de la arteria temporal.

Referencia:

Bird HA, Esselinckx W, Dixon AS, Mowat AG, Wood PH. An evaluation of criteria for polymyalgia rheumatica. Ann Rheum Dis. 1979 Oct; 38(5):434-9.

17. Criterios de clasificación para dermatomiositis y polimiositis (1975)

| |
|--|
| Criterio |
| 1. Debilidad muscular proximal simétrica |
| 2. Elevación de los niveles séricos de enzimas del músculo esquelético, incluyendo creatina cinasa (CK), aldolasa, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LH) |
| 3. Electromiografía anormal (EMG) con potenciales de unidades motoras miopáticas, fibrilaciones, ondas agudas positivas y mayor irritabilidad de inserción. |
| 4. Características de la biopsia muscular de infiltración inflamatoria y degeneración/regeneración o atrofia perifascicular. |
| 5. Erupción cutánea típica de dermatomiositis, que incluye el signo de Gottron, las pápulas de Gottron o la erupción de heliotropo |
| Polimiositis definitiva: criterios 1-4; probable polimiositis: tres de los criterios 1-4; posible polimiositis: dos de los criterios 1-4; dermatomiositis definitiva: criterio 5 y tres de los criterios 1-4; probable dermatomiositis: criterio 5 y dos de los criterios 1-4; posible dermatomiositis: criterio 5 y uno de los criterios 1-4. |
| La aplicación de estos criterios supone que las evaluaciones apropiadas han excluido las miopatías infecciosas, tóxicas, metabólicas, distróficas o endocrinas conocidas. |
| La simetría pretende denotar una participación bilateral pero no necesariamente igual. |

5

Referencia:

1. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (primera de dos partes). N Engl J Med. 1975; 292:344-7.

2. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (segunda de dos partes). N Engl J Med. 1975; 292:403-7.

18. Criterios para el diagnóstico de fiebre mediterránea familiar (FMF).

| |
|---|
| Criterio principales |
| Ataques típicos |
| 1. Peritonitis (generalizada) |
| 2. Pleuritis (unilateral) o pericarditis |
| 3. Monoartritis (cadera, rodilla, tobillo) |
| Criterios menores |
| 1-3. Ataques incompletos que implican uno o más de los siguientes sitios: |
| 1. Abdomen |
| 2. Pecho |
| 3. Articulación |
| 4. Dolor de pierna por esfuerzo |
| 5. Respuesta favorable a la colchicina |
| Criterios de apoyo |
| 1. Antecedentes familiares de FMF |

| |
|---|
| <p>2. Origen étnico apropiado</p> <p>3. Edad menor de 20 años al inicio de la enfermedad</p> <p>4.-6. Características de los ataques: 4. Grave, que requiere reposo en cama; 5. Remisión espontánea; 6. Intervalo sin síntomas</p> <p>7. Respuesta inflamatoria transitoria, con uno o más resultados de ensayo anormales para recuento de glóbulos blancos, velocidad de sedimentación globular, amiloide A sérico y/o fibrinógeno</p> <p>8. Proteinuria/hematuria episódica</p> <p>9. Laparotomía improductiva o eliminación del apéndice "blanco"</p> <p>10. Consanguinidad de los padres</p> |
| <p>Los requisitos para el diagnóstico de FMF son uno o más criterios principales, o dos o más criterios menores, o uno menor más cinco o más criterios de apoyo, o un criterio menor más cuatro o más de los primeros cinco criterios de apoyo. Los ataques típicos se definen como recurrentes (tres o más del mismo tipo), febriles (temperatura rectal de 38°C o más) y cortos (que duran entre 12 h y 3 días). Los ataques incompletos se definen como ataques dolorosos y recurrentes que difieren de los ataques típicos en una o dos características de la siguiente manera: la temperatura es normal o inferior a 38°C; los ataques son más largos o más cortos de lo especificado (pero no menos de 6 h o más de una semana); no se registran signos de peritonitis durante los ataques abdominales; los ataques abdominales están localizados; la artritis se encuentra en articulaciones distintas a las especificadas. Los ataques no se cuentan si no se ajustan a la definición de ataques típicos o incompletos.</p> |

Referencia:

Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, Migdal A, Padeh S, Pras M. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 1997 Oct; 40(10):1879-85.

5 19. Clasificación de los síndromes autoinflamatorios de fiebre periódica

| Enfermedades | Gen/cromosoma | Proteína | Características clínicas |
|---|--|--|---|
| <p>Fiebres periódicas/recurrentes</p> <ul style="list-style-type: none"> Fiebre mediterránea familiar (FMF) Deficiencia de mevalonato | <p><i>MEVF 16p13.3</i></p> <p><i>MVK 12q24</i></p> | <p>Pirina</p> <p>Mevalonato cinasa</p> | <p>véase anteriormente</p> <p>inicio temprano (generalmente <12 meses); duración media de los episodios de fiebre de 4 a 5 días. Malas condiciones durante los episodios de fiebre. Dolor abdominal, vómitos y diarrea. Esplenomegalia. Buena respuesta a los esteroides. Alta tasa de auto-resolución durante la edad adulta. La amiloidosis es rara.</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> Síndrome periódico asociado al receptor de TNF Fiebre periódica asociada a NALP12 | <p><i>TNFRSF1A 12p13</i></p> <p><i>NALP12</i></p> | <p>Receptor de TNF P55</p> <p>NALP12</p> | <p>Episodios de fiebre prolongada 1-3 semanas. Edema periorbitario, fascitis monocítica. Incidencia de amiloidosis renal. Respuesta al bloqueo de TNF e IL1.</p> <p>Fiebre periódica después de la exposición al frío, pérdida de audición</p> |
| Criopirinopatías | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome autoinflamatorio familiar por frío (FCAS) • Síndrome de Muckle-Wells (MWS) • Síndrome neurológico, cutáneo y articular infantil crónico (CINCA) | CIAS/NALP3 1q44 | Criopirina | <p>FCAS: erupción, fiebre y artralgia después de la exposición al frío</p> <p>MWS: lesiones recurrentes o subcrónicas similares a la urticaria, pérdida auditiva sensorineural, amiloidosis</p> <p>CINCA: como antes, más retraso mental, meningitis aséptica crónica y deformidades óseas.</p> <p>Todos: buena respuesta al bloqueo de IL1.</p> |
| <p>Trastornos granulomatosos</p> <p>Síndrome de Blau</p> | CARD15/NOD2 16q12 | CARD15 | <p>Inicio temprano (<5 años). Artritis granulomatosa poliarticular, uveítis, erupción cutánea. Buena respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-TNF.</p> |
| <p>Trastornos piogénicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de artritis piógena estéril, pioderma gangrenoso y acné (PAPA) • Síndrome de Majeed • CRMO (murino) | <p>PSTPIP1 15q24-q25.1</p> <p>LPIN2 18p</p> <p>PSTPIP2 18p</p> | <p>PSTPIP1</p> <p>LPIN2</p> <p>PSTPIP2</p> | <p>Artritis piógena estéril, pioderma gangrenoso, acné quístico. Buena respuesta al bloqueo de IL1.</p> <p>Osteomielitis multifocal, anemia diseritropoyética congénita, dermatosis inflamatoria</p> |

Referencia:

Eular Compendium on Rheumatic Diseases, Capítulo: The autoinflammatory diseases. Marco Gattorno, Katia Stankovic, Maria Antonietta Pelagatti, Gilles Grateau. 375-378.

5 En realizaciones alternativas, los métodos y kits de la invención pueden usarse para identificar a aquellos individuos que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria autoinmune.

10 En un aspecto de la descripción, se analizan al menos dos muestras, o al menos tres muestras, o al menos cuatro muestras, o al menos cinco muestras obtenidas del mismo individuo en diferentes puntos de tiempo, para determinar la presencia o la cantidad de ANmt (por ejemplo ADNmt o ARNmt). Esto puede incluir la recopilación de datos durante un período de tiempo. Se pueden tomar muestras de un paciente a intervalos regulares. El intervalo puede variar de alrededor de 2 a alrededor de 12 meses, o de alrededor de 4 a alrededor de 8 meses, o varía de alrededor de 5 a alrededor de 7 meses (por ejemplo, alrededor de 6 meses). Esto permite la monitorización de la progresión de la AID durante diversos períodos de tiempo.

Kits y otros aspectos de la invención

15 En aspectos alternativos, la descripción proporciona kits que tienen componentes para uso en los métodos de la descripción. Dichos kits pueden comprender componentes de PCR, como se establece en los ejemplos a continuación, que incluyen cebadores de PCR específicos para una secuencia de ADNmt o ANmt y para la secuencia de ADN nuclear o ARN nuclear. Dichos kits también pueden incluir instrucciones escritas para llevar a cabo los métodos de la invención tal como se describe en ellos.

20 Según una realización preferida, el kit comprende un par de cebadores capaz de amplificar específicamente ADNmt o ARNmt en una reacción de PCR, al menos un oligonucleótido capaz de hibridarse específicamente con ANmt, o un

anticuerpo que reconoce específicamente ANmt, o un ligando de hidrato de carbono que reconoce específicamente ANmt, o un ligando no de hidrato de carbono que reconoce ANmt, o una enzima que se dirige más o menos específicamente a ANmt en uno o varios sitios. Preferiblemente, el kit comprende además un par de cebadores capaz de amplificar específicamente ADNn o ARNn en una reacción de PCR. Lo más preferible, el kit comprende al menos un par de cebadores capaz de amplificar específicamente ADNmt en una reacción de PCR, y al menos un par de cebadores capaz de amplificar específicamente ADNn en una reacción de PCR.

Preferiblemente, el kit comprende compuestos adicionales para determinar uno o más marcadores distintos de AID. Es decir, el kit puede comprender medios (por ejemplo, par de cebadores; sonda de oligonucleótidos; anticuerpo, etc.) para determinar al menos un marcador o criterio mencionado en los criterios de clasificación anteriores 1-19 descritos anteriormente.

Otro aspecto de la presente descripción es el uso de un par de cebadores para el diagnóstico o exclusión diagnóstica de una AID. El par de cebadores es capaz de amplificar específicamente un ADN o ARN mitocondrial. Usualmente, los cebadores oligonucleotídicos adecuados tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos, preferiblemente de al menos 15 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 20 nucleótidos. Los cebadores oligonucleotídicos pueden tener una longitud de alrededor de 15 a 35 nucleótidos.

Otro aspecto de la descripción es el uso de ácidos nucleicos mitocondriales (por ejemplo, ADNmt o ARNmt) como un marcador positivo o negativo para la presencia y/o progresión y/o actividad de una AID tal como AAV, inflamación de vasos de tamaño grande o mediano, enfermedades del tejido conjuntivo (SLE, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, síndromes de superposición y síndrome de Sjögren), enfermedad inflamatoria intestinal, artritis, gota, pseudogota, sarcoidosis, enfermedad de Behcet, enfermedad de Still de inicio en adultos, fiebre mediterránea familiar, síndromes autoinflamatorios de fiebre periódica (por ejemplo síndromes de fiebre asociados a criopirina, y otros), o ARDS. Una realización preferida de este aspecto corresponde a las realizaciones preferidas del método y el uso descritos anteriormente. De acuerdo con un aspecto preferido de la descripción, el ADNmt se usa como marcador para la progresión de la AID.

La descripción se refiere además a un método de detección para identificar compuestos eficaces en el tratamiento de AID, que comprende

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una célula; y

(b) determinar la cantidad de ANmt (por ejemplo, ADNmt o ARNmt) liberado por la célula. Las células adecuadas que pueden usarse en el método de detección de la invención incluyen, pero no se limitan a, leucocitos neutrófilos y eosinófilos, células dendríticas, células de Langerhans, linfocitos, células asesinas naturales (NK), macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, células alveolares, células mucosales, plaquetas, células epiteliales, células epiteliales tubulares.

El método de detección puede comprender además la etapa de seleccionar el compuesto de ensayo, si el compuesto de ensayo inhibe la liberación por la célula de ANmt.

Se puede considerar que un compuesto de ensayo inhibe la liberación por la célula del ANmt si la liberación por la célula del ANmt en presencia del compuesto de ensayo se reduce en al menos 10%, preferiblemente en al menos 20%, más preferiblemente en al menos 30%, incluso más preferiblemente en al menos 40%, aún más preferiblemente en al menos 50%, con relación a la liberación por la célula del ANmt en ausencia del compuesto de ensayo.

Las realizaciones descritas en el presente documento con respecto a la AID se pueden aplicar a otros trastornos autoinmunes u otros trastornos inflamatorios autoinmunes. Las realizaciones descritas en el presente documento con respecto al ADNmt pueden aplicarse a otros ácidos nucleicos mitocondriales, tales como el ARNmt.

Ejemplos

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS TABLAS Y DIBUJOS

Tabla 1. Predictores univariados y multivariados de copias de ADNmt circulante/ml de plasma en pacientes con AAV. El coeficiente de regresión lineal 'b' representa la cantidad en la cual el ADNmt aumenta en promedio, si la covariable aumenta en una unidad. AAV, vasculitis asociada a ANCA; WG, granulomatosis de Wegener; BVAS, puntuación de actividad de vasculitis de Birmingham (vs. 3); CRP, proteína C reactiva; MPO, mieloperoxidasa.

Tabla 2. Predictores uni- y multivariados de BVAS en pacientes con AAV. El coeficiente de regresión lineal 'b' representa la cantidad mediante la cual BVAS aumenta en promedio, si la covariable aumenta en una unidad. Para otras abreviaturas, consulte la Tabla 1.

- 5
 Tabla 3. Predictores univariados y multivariados de copias de ADNmt circulante/ml de plasma en pacientes con SLE. El coeficiente de regresión lineal 'b' representa la cantidad mediante la cual el ADNmt aumenta en promedio, si la covariable aumenta en una unidad. (SLE; Lupus eritematoso sistémico; SLEDAI, Índice de actividad de la enfermedad del SLE, C3 y C4; componentes del complemento sérico 3 y 4, C3d; producto de escisión del componente del complemento sérico C3)
- 10
 Tabla 4. Predictores uni- y multivariados de SLEDAI entre pacientes con SLE. El coeficiente de regresión lineal 'b' representa la cantidad mediante la cual el SLEDAI aumenta en promedio, si la covariable aumenta en una unidad. Para otras abreviaturas, consulte la Tabla 3.
- 15
 Figura 1. Niveles séricos de autoanticuerpos anti-PR3 en pacientes estudiados con AAV y sujetos de control sin AID. El ELISA de PR3 tiene un valor de corte de 10 U/l. Las barras dentro de cada grupo representan valores de la mediana.
- 20
 Figura 2 El panel superior representa gráficamente curvas de amplificación de PCR LightCycler de ADNmt (B), ADNn (C) y diluciones de 10 veces del plásmido estándar (A), cada uno por triplicado. El control negativo (H₂O) está marcado con D. El panel inferior muestra una curva estándar representativa obtenida de diluciones de plásmidos en serie por triplicado (puntos grises) que demuestra una eficiencia de PCR de 1,939 por ciclo (siendo una eficiencia de 2 el óptimo teórico). El punto de cruce fue calculado automáticamente por el software LightCycler.
- 25
 Figura 3. Correlaciones entre BVAS y sus predictores independientes que se identificaron mediante análisis multivariado (números de neutrófilos y copias de ADNmt) en pacientes con AAV. A modo de comparación, también se representa gráficamente la correlación entre BVAS y CRP. Para los coeficientes de correlación, véase la Tabla 2.
- 30
 Figura 4. Curva característica de funcionamiento del receptor (ROC) para el ensayo de ADNmt en todos los pacientes con AAV (independientemente de la actividad de vasculitis).
- 35
 Figura 5. En comparación con el plasma de los sujetos de control (n = 26), la cantidad de ADNmt en el plasma de las personas diagnosticadas con SLE (n = 41) está aumentada significativamente (p <0,001). La cantidad de ADNmt más alta medida de los sujetos de control es menor que la cantidad de ADNmt más baja en los sujetos con SLE. Los 'bigotes' en la gráfica representan los percentiles 5% y 95%.
- 40
 Figura 6A. Correlaciones univariadas estadísticamente significativas entre los niveles de ADNmt circulante en plasma y otros posibles indicadores de actividad de la enfermedad del SLE. Entre todos los pacientes con SLE, la cantidad de ADNmt se correlacionó positivamente con el resultado del ensayo de ELISA de ADNbc-anticuerpo (R = 0,24; p = 0,004), la cantidad del producto dividido del factor del complemento 3 C3d en el plasma de los sujetos (R = 0,38; p <0,001; B) y la actividad de la enfermedad de SLE en términos de SLEDAI (R = 0,32; p <0,001). El ADNmt se correlacionó inversamente con las cantidades de factor del complemento nativo 3 (C3) en plasma de sujetos (R = -0,13; p <0,001).
- 45
 Figura 6B. Las cantidades de plasma de ADNmt circulante no se correlacionaron con los números de neutrófilos en sangre periférica, la proteína C reactiva (CRP), la hipertensión arterial, la duración de la enfermedad y la creatinina sérica.
- 50
 Figura 7. Comparación mediante diagrama de cajas entre sujetos de control (n = 26) y sujetos con esclerodermia (SSc, esclerosis sistémica, n = 4). La cantidad de ADNmt fue significativamente mayor en el grupo de esclerodermia que en los sujetos de control (p = 0,002). Las barras dentro de cada grupo representan valores de la mediana, los 'bigotes' en la gráfica representan los percentiles 5% y 95%.
- Figura 8. En comparación con el plasma de los sujetos de control (n = 26), la cantidad de ADNmt en el plasma de individuos con arteritis de células gigantes (GCA) (n = 25) aumentó significativamente (p <0,001). Las barras dentro de cada grupo representan valores de la mediana, los 'bigotes' en la gráfica representan los percentiles 5% y 95%.
- Figura 9. Números de copias de ADNmt circulante en el plasma de sujetos de control (n = 26) en comparación con el síndrome de Sjögren (SS, n = 1). Las barras dentro de cada grupo representan valores de la mediana, los 'bigotes' en la gráfica representan los percentiles 5% y 95%.
- Figura 10. Cantidades de plasma de ADNmt circulante libre en las artropatías cristalinas tales como gota activa (n = 3) y la pseudogota activa (n = 1). Las barras dentro de cada grupo representan valores de la mediana, los 'bigotes' en la gráfica representan los percentiles 5% y 95%.

Ejemplo 1: vasculitis asociada a ANCA (AAV)

Métodos

Pacientes con AAV y controles

5 Después de la aprobación del comité de ética, los sujetos dispuestos a dar su consentimiento por escrito fueron reclutados consecutivamente desde julio de 2010 hasta marzo de 2011. Este estudio incluyó pacientes adultos que asistieron a los Departamentos de Reumatología de Friburgo y Basilea que se clasificaron como AAV (WG, CSS o MPA)¹⁵. Los criterios de exclusión consistieron en infecciones bacterianas o virales activas, traumatismos, neoplasia, cirugía reciente, así como otras AID sistémicas concomitantes (por ejemplo, artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria intestinal)^{16,17}.

10 Los voluntarios y sujetos adultos sanos hospitalizados por fracturas de la columna osteoporótica o discos intervertebrales herniados sin enfermedad inflamatoria concomitante, como también se evidencia por una proteína C reactiva normal (CRP), sirvieron como controles.

15 En todos los sujetos, se recogieron 9 ml de sangre periférica venosa en un tubo de EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Inmediatamente después de la extracción de sangre, la sangre con EDTA se centrifugó (Hettich, Rotanta 460, Alemania) a 2000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El plasma se recogió cuidadosamente sin alterar ni aspirar la capa leucocitaria, se dividió en alícuotas y se colocó en un congelador a -80°C hasta el procesamiento. Paralelamente, se tomó una muestra de suero para la cuantificación centralizada de los niveles de CRP, de autoanticuerpos anti-PR3 y anti-MPO (Orgentec, Mainz, Alemania). Como parte de su cuidado de rutina, se evaluó el transporte nasal de *S. aureus* con un cultivo con torunda. La tensión arterial de los pacientes se midió para detectar hipertensión arterial, definida como presión sistólica por encima de 140, o presión diastólica por encima de 90 mmHg. La actividad de vasculitis se puntuó mediante la puntuación de actividad de vasculitis de Birmingham (BVAS, versión 3)¹⁸, una puntuación que se ha mostrado que se correlaciona con la decisión de tratamiento¹⁹.

Cuantificación de números de copias de ADN circulante

25 El ADN total se extrajo del plasma (1 ml) con el kit de aislamiento de ADN QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania). Los números de copias de ADNmt y ADN nuclear (ADNn) se cuantificaron en un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) Roche LightCycler 480, equipado con la placa de pocillos múltiples 384 Light Cyclor 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) mediante un colorante de intercalación de ADN (SYBR Green I)²⁰. El gen ATP-6 de ADNmt se amplificó entre las posiciones nucleotídicas 8981 y 9061 con el cebador directo 5'-ACCAATAGCCCTGGCCGTAC-3' (SEQ ID NO:1) y el cebador inverso 5'-GGTGGCGCTTCCAATTAGGT-3' (SEQ ID NO:2). Para la detección de ADNn, seleccionamos el exón número 8 del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) entre las posiciones nucleotídicas 4280 y 4342, y utilizamos el cebador directo 5'-CGGGGCTCTCCAGAACATC-3' (SEQ ID NO:3) y el cebador inverso 5'-ATGACCTTGCCACAGCCT-3' (SEQ ID NO:4). Cada reacción de PCR de 25 µl contenía 20 ng de ADN genómico, sonda 100 nM, cebadores 200 nM y LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La reacción de PCR consistió en una etapa inicial de desnaturalización del ADN de 5 min a 95°C, seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, alternando con 1 min a 60°C y 15 segundos a 72°C. La especificidad del producto de PCR amplificado se evaluó con una curva de fusión. Los números absolutos de copias de ADNmt y ADNn se calcularon usando diluciones en serie de plásmidos con números de copia conocidos²⁰. Las amplificaciones de productos mitocondriales y nucleares se realizaron por triplicado. Un control negativo y una curva estándar se incluyeron en cada experimento.

Análisis estadístico

45 Los resultados entre los grupos se compararon mediante la prueba de la t no pareada o el análisis de Wilcoxon, según corresponda. Dentro de los grupos, las variables se estudiaron mediante análisis de regresión lineal univariado y multivariado. El análisis de los datos se realizó con STATA 11.0 (stataCorp Inc., College Station, Texas, USA). Las regresiones se representaron gráficamente con Sigma Plot version 8.0 (SPSS Inc., USA). Todos los ensayos estadísticos fueron de dos colas, y un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Participantes

50 Treinta y un controles sanos (18 mujeres) se ofrecieron como voluntarios para este estudio. Su edad media fue 43 años (intervalo 20-75 años). En todos los pacientes de control, la CRP estuvo dentro de los límites normales y los ANCA fueron negativos.

Se incluyeron cincuenta y cuatro pacientes (19 mujeres) con AAV cumplido. Su edad media fue 58 años (intervalo 26-81 años) y su duración media de la enfermedad fue 5,4 años (intervalo 0,1-23,5 años). 40 pacientes tenían WG, doce tenían CSS y dos tenían MPA. 22 pacientes con AAV tenían antecedentes de insuficiencia renal y 37 pacientes

tenían antecedentes de implicación pulmonar. Entre los pacientes con WG, 6 tenían WG localizada y 34 tenían WG sistémica. La mediana de BVAS de todos los pacientes con AAV en el momento de la extracción de sangre fue 5 (intervalo intercuartil (IQR 1-7) y la mediana equivalente de prednisona fue 8 mg/día (IQR 5-15).

5 En el momento del análisis de ADNmt, 59% de los pacientes con AAV tenían un ANCA-PR3 elevado basado en ELISA (>10 U/ml). La mediana del nivel sérico de PR3 de todos los pacientes con AAV fue 49 U/l (IQR 1-142, Figura 1). 8% de los pacientes con AAV tenían un MPO-ANCA elevado basado en ELISA (>20 U/ml), 2 de estos pacientes tenían WG, uno tenía CSS, y un paciente tenía MPA. La mediana de CRP de los pacientes con AAV fue 1,7 mg/l (IQR 1,7-8,0), y la mediana del recuento de neutrófilos fue $6,0 \times 10^9/\text{ml}$ (IQR 5,3-8,0). La creatinina sérica era elevada (>1,2 mg/l) en 13 sujetos con AAV. El hisopo nasal fue positivo para *S. aureus* en nueve de los 34 pacientes con AAV analizados, ocho de los cuales tenían WG.

Calidad del ensayo

15 Nuestro ensayo fue altamente preciso y reproducible (Figura 2). Entre todas las muestras de plasma con AAV, el coeficiente de variación intraexperimento (variación estándar de los triplicados en un experimento dividido en la media) fue 2,8% para el ADNmt y 5,3% para el amplicón de ADNn. El coeficiente de variación entre experimentos (la variación estándar en dos experimentos diferentes dividida entre la media) fue 5,4% tanto para ADNmt como para ADNn.

También investigamos el impacto de la hemólisis forzando repetidamente la sangre rápidamente a través de una aguja delgada (21G). Este procedimiento causó un tinte rojo visible en el plasma, pero aumentó las cantidades de ADNmt detectadas en solo 5% en comparación con alícuotas no hemolíticas.

20 Números de copias de ADN mitocondrial circulante

La mediana del número de copias de ADNmt en el plasma de control fue 15.400/ml (IQR 10.992-31.233). El número más alto de copias de ADNmt entre las 31 muestras de plasma de control examinadas fue 86.333/ml, y la medida más baja fue 368/ml.

25 En todos los pacientes con AAV, la mediana del número de copias de ADNmt circulante fue 449.683/ml (IQR 257.500-1.120.000). En comparación con la mediana de las copias de ADNmt en voluntarios sanos, esto representa un aumento en un factor de 29,2 ($p < 0,001$). El número más bajo de copias de ADNmt en pacientes con AAV fue 27.167/ml, y el más alto fue 4.426.666/ml. La mediana del número de copias de ADNmt en los 12 pacientes con CSS fue 323.667/ml (IQR 47.750-498.717), y 473.017/ml en los 2 pacientes con MPA.

30 Nueve de los 54 pacientes con AAV (16,7%) tenían copias de ADNmt circulante por debajo del valor más alto (86.333/ml) de los 31 controles sanos. Cuatro de estos nueve pacientes con AAV tenían CSS, y 5 tenían WG. Los niveles plasmáticos de ADNmt de los subgrupos WG, CSS y MPA se representan gráficamente en la Figura 3A.

Predictores de copias de ADNmt

35 Similar a la situación en voluntarios sanos, los números de copias de ADNmt en pacientes con AAV no se correlacionaron con el género o la edad en el análisis univariado (Tabla 1). Los niveles de ADNmt circulante tampoco se asociaron con la presencia o ausencia de implicación pulmonar o renal en los antecedentes del paciente. Del mismo modo, los niveles plasmáticos de ADNmt tampoco se asociaron con la tensión arterial, los niveles de autoanticuerpos anti-PR3 o autoanticuerpos anti-MPO circulantes, la creatinina sérica o el transporte nasal de *S. aureus* en el momento de la extracción de sangre (Tabla 1). La medicación con corticosteroides no suprimió los niveles de ADNmt circulante. De hecho, las copias de ADNmt se correlacionaron con el consumo diario de equivalentes de prednisona, probablemente como resultado de la actividad de la enfermedad (véase más abajo).

40 En el análisis univariado de todos los pacientes con AAV, los niveles plasmáticos de ADNmt circulante también se correlacionaron con los recuentos de neutrófilos de sangre periférica ($R^2 = 0,138$, $p = 0,006$) y CRP sérica ($R^2 = 0,339$, $p < 0,001$), pero el coeficiente de correlación fue mayor con BVAS ($R^2 = 0,588$, $p < 0,001$). En el subgrupo de WG, las covariables que fueron significativas en la comparación univariada fueron el recuento de neutrófilos ($R^2 = 0,175$), CRP sérica ($R^2 = 0,368$), y BVAS ($R^2 = 0,605$, Tabla 1). Después del análisis multivariante, solo BVAS y CRP se mantuvieron predictivas para los niveles de ADNmt circulante. Los valores de R^2 ajustados en los modelos multivariados fueron 0,678 para los pacientes con AAV y 0,693 para el subgrupo de WG, lo que indica que la CRP contribuye muy poco a la bondad del ajuste en ambos modelos, y que BVAS es el principal factor de conducción y el mejor predictor de niveles plasmáticos de ADNmt.

50

Tabla 1

| | Todos AAV (n=54) | | WG solamente (n=40) | |
|---|-------------------------|--------|-------------------------|---------|
| | b (95% CI) | p | b (95% CI) | p |
| <i>Análisis univariado</i> | | | | |
| Género | | 0,40 | | 0,37 |
| Edad del paciente (años) | | 0,11 | | 0,47 |
| Duración de la enfermedad (años) | | 0,86 | | 0,66 |
| BVAS vs.3 | 170656 (130489, 210823) | <0,001 | 173088 (126542, 219633) | <0,001 |
| Hipertensión arterial | | 0,43 | | 0,49 |
| Recuento de neutrófilos sanguíneos (10 ⁹ /l) | 185623 (55290, 315956) | 0,006 | 215465 (59362, 371568) | 0,008 |
| Anticuerpo sérico anti-PR3 (U/l) | | 0,68 | | 0,91 |
| Anticuerpo sérico anti-MPO (U/l) | | 0,48 | | 0,43 |
| CRP sérica (mg/l) | 60539 (36781, 84298) | <0,001 | 60173 (34271,86074) | <0,001 |
| Creatinina sérica (mg/l) | | 0,99 | | 0,71 |
| Transporte nasal de S. aureus | | 0,83 | | 0,90 |
| <i>Análisis multivariado</i> | | | | |
| BVAS vs.3 | 149112 (105570,192653) | <0,001 | 150749 (98625, 202874) | <0,001* |
| CRP sérica (mg/l) | 35349 (15169, 55530) | 0,001 | 34466 (11202,57729) | 0,005 |
| Recuento de neutrófilos sanguíneos (10 ⁹ /l) | | 0,37 | | 0,41 |

Números de copias de ADN nuclear circulante

5 También analizamos los números de copias de ADNn circulante para excluir la posibilidad de una actividad alterada de ADNasa como mecanismo para el aumento observado de los niveles de ADNmt. Si la actividad de ADNasa se vio de hecho alterada de manera no específica en AAV, esperaríamos también una mejora de los niveles de ADNn. La mediana del número de copias de ADNn en el plasma de control fue 5.747/ml (IQR 2.863-9.798), pero este valor no difirió de los pacientes con AAV (mediana del número de copias de ADNn 5.125/ml, IQR 2.222-11.233, p = 0,93). En los pacientes tanto con AAV como con WG, los niveles de ADNn no se asociaron con la edad o el sexo, ni se correlacionaron de forma univariada o multivariada con ninguna de las variables de la Tabla 1. Este hallazgo no respalda un deterioro inespecífico de las DNasas como mecanismo para el aumento observado de ADNmt en AAV.

10 Después calculamos la relación de los números de copias de ADNmt y ADNn circulantes en cada muestra de plasma. La mediana de la relación ADNmt/ADNn fue de 3,2 (IQR 1,9-8,5) en pacientes de control, y 246 (IQR 38-562) en pacientes con AAV. Este hallazgo respalda la hipótesis de una liberación mejorada de ADNmt. La relación ADNmt/ADNn no se correlacionó de forma univariada ni multivariada con ninguna de las características de los pacientes enumeradas en la Tabla 1, incluyendo CRP y recuentos de neutrófilos de sangre periférica.

Predictores de BVAS

20 A continuación, analizamos por medio de un análisis de regresión lineal, si los niveles plasmáticos de ADNmt podrían ser útiles para predecir la actividad de la enfermedad en términos de BVAS en AAV (Tabla 2). En las comparaciones univariadas, las variables significativas fueron el recuento de neutrófilos en sangre (R² = 0,207), niveles de CRP (R² = 0,184), y ADNmt (R² = 0,588). Estos factores también fueron significativos en el análisis aislado del subgrupo de pacientes con WG, con un R² de 0,252 para el recuento de neutrófilos en sangre, 0,220 para los niveles de CRP, y el R² más elevado (0,605) para el ADNmt (Figura 3B). En el análisis multivariado, solo los

niveles de ADNmt y los recuentos de neutrófilos se mantuvieron covariables en el modelo, generando un valor de R^2 ajustado de 0,635 en AAV, y 0,657 en WG. Como se puede esperar de los hallazgos anteriores, los números de copias de ADNn y la relación ADNmt/ADNn no se correlacionaron con BVAS. En conjunto, nuestros resultados indican que, entre todas las variables enumeradas en la Tabla 2, los niveles plasmáticos de ADNmt son el mejor predictor de la actividad de la enfermedad en AAV.

5

Tabla 2

| | Todos AAV (n=54) | | WG solamente (n=40) | |
|---|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | b (95% CI) | p | b (95% CI) | p |
| <i>Análisis univariado</i> | | | | |
| Género | | 0,41 | | 0,62 |
| Edad del paciente (años) | | 0,94 | | 0,70 |
| Duración de la enfermedad (años) | | 0,28 | | 0,31 |
| Hipertensión arterial | | 0,84 | | 0,79 |
| Recuento de neutrófilos sanguíneos | 1,03 (0,46, 1,60) | 0,001 | 1,18 (0,49, 1,86) | 0,001 |
| Anticuerpo sérico anti-PR3 (U/l) | | 0,56 | | 0,71 |
| Anticuerpo sérico anti-MPO (U/l) | | 0,79 | | 0,97 |
| CRP sérica (mg/l) | 0,20 (0,08, 0,32) | 0,002 | 0,21 (0,08, 0,34) | 0,003 |
| Creatinina sérica (mg/l) | | 0,89 | | 0,77 |
| Transporte nasal de S. aureus | | 0,96 | | 0,84 |
| ADNmt (copias/ml de plasma) | 0,008 (0,006, 0,011) | <0,001 | 0,008 (0,006, 0,011) | <0,001 |
| ADNn (copias/ml de plasma) | | 0,76 | | 0,72 |
| Relación ADNmt/ADNn | | 0,13 | | 0,23 |
| <i>Análisis multivariado</i> | | | | |
| CRP sérica (mg/l) | | 0,30 | | 0,37 |
| Recuento de neutrófilos sanguíneos ($10^9/L$) | 0,53 (0,07, 0,99) | 0,03 | 0,59 (0,03, 1,16) | 0,04 |
| ADNmt (copias/ml de plasma) | 0,008 (0,006, 0,011) | <0,001 | 0,008 (0,005, 0,011) | <0,001 |

Utilidad diagnóstica de ADNmt circulante

Examinamos la utilidad diagnóstica del ensayo de nivel plasmático de ADNmt circulante, si se aplicó para el diagnóstico de AAV a nuestra población de estudio (todos los voluntarios sanos más todos los pacientes con AAV). La curva de características operativas del receptor (ROC) determinó un valor de corte óptimo de 178.000 copias de ADNmt/ml de plasma, con un área bajo la curva ROC de 0,968 (Figura 4), produciendo una sensibilidad del ensayo del 83,3%, una especificidad del 100%, y una relación de probabilidad positiva de alrededor de 25,8. En el subgrupo de WG, el área bajo la curva ROC sería 0,975, y el mismo corte daría como resultado una sensibilidad del 87,5%, una especificidad del 100%, y una relación de probabilidad positiva de alrededor de 27,1.

En los 9 pacientes con AAV con copias de ADNmt circulante por debajo del valor más alto de los controles, la BVAS fue 0 en seis pacientes; y 3, 6 y 10 en los tres pacientes restantes con AAV, respectivamente. Esta observación indica que el valor predictivo positivo del análisis de ADNmt mejoraría aún más, si solo se considerara la vasculitis activa, en lugar de una combinación de pacientes con AAV con enfermedad tanto activa como inactiva.

Discusión

Nuestros resultados documentan un aumento profundo del número de copias de ADNmt circulante en el plasma de pacientes con AAV, lo que refuerza la evidencia de una implicación de la inmunidad innata en la patogénesis de esta forma de vasculitis.

Se ha demostrado previamente que la estimulación *in vitro* de leucocitos humanos primarios con anticuerpos anti-PR3 mejora su expresión de TLR9 y promueve su liberación de citocinas tras la estimulación con componentes microbianos²¹. Aunque los anticuerpos PR3 ceban neutrófilos para la NETosis *in vitro*, sorprendentemente no pudimos detectar una relación directa entre los niveles de ADNmt y PR3 en nuestro estudio clínico. La falta de una correlación entre los niveles plasmáticos de PR3-ANCA y ADNmt sugiere la presencia *in vivo* de mecanismos contrainflamatorios, estímulos proinflamatorios adicionales, o fuentes no neutrófilas de liberación de ADNmt⁷ que oscurecen una relación medible entre los niveles plasmáticos de ANCA y ADNmt, mientras que aún permite una buena correlación entre el ADNmt y la actividad de vasculitis.

Curiosamente, la transferencia de IgG que contiene PR3-ANCA a ratones de tipo salvaje no indujo vasculitis sistémica^{4,22}, mientras que las concentraciones clínicamente relevantes de ADNmt no solo activan neutrófilos a través de TLR9, sino que inducen inflamación de órganos locales y distantes^{4,23}. Aunque también se sabe que los componentes de *S. aureus* ceban neutrófilos para NETosis *in vitro*^{13,24}, no hemos podido detectar una relación entre la colonización nasal de *S. aureus* y el contenido de ADNmt.

Nuestros resultados sugieren que la relevancia patogénica del ADNmt circulante puede exceder la de PR3-ANCA⁴. Otra hipótesis a explorar es que PR3-ANCA y *S. aureus* participan en la activación local de neutrófilos, mientras que la implicación sistémica de órganos depende del ADNmt. El papel de los neutrófilos como una posible fuente de ADNmt está indicado por la observación de que el AAV se previene mediante el agotamiento de los neutrófilos en modelos de ratón²⁵ y nuestra observación de que los números de neutrófilos están asociados de manera univariada con los niveles de ADNmt circulante. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que las plaquetas que se activan en WG y que contienen ADNmt pero no ADNn representen otra fuente de ADNmt circulante²⁶.

No pudimos detectar un aumento del ADNn circulante en AAV. Los niveles plasmáticos de ADNn inalterados en AAV argumentan contra un deterioro inespecífico de la degradación del ADN como un posible mecanismo de nuestros hallazgos, y apuntan hacia una degradación dispareja de las especies de ADN circulante, o una mejora aislada de la liberación de ADNmt. Se ha sugerido anteriormente que los NETs liberados de los eosinófilos consisten en ADNmt^{6,7}, pero tal relación no se ha hecho para los NETs liberados de neutrófilos¹³. Incluso se ha sugerido que los NETs formados en respuesta a *S. aureus* contienen predominantemente ADNn²⁴. Los números de copias de ADNn inalterado en nuestro estudio, y la observación de que el ADNn no es inflamogénico *in vivo*²³, también sugieren que la cuantificación de los números de copias de ADNn no mejora el rendimiento de un posible ensayo de diagnóstico.

Nuestro estudio demuestra que los números elevados de copias de ADNmt circulante detectan AAV activo con buena sensibilidad. Aún más importante, los números de copias de ADNmt circulante se asociaron con la actividad de vasculitis en nuestra población seleccionada, mientras que otros posibles indicadores de actividad de la enfermedad, tales como los niveles de CRP y PR3, tuvieron una correlación más débil o nula con BVAS, de acuerdo con las observaciones anteriores^{19,27,28}.

Ejemplo 2: lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (SLE) es una AID caracterizada por la activación de células B y la producción de autoanticuerpos contra una variedad de autoantígenos. Otra característica clave del SLE consiste en la presencia de células dendríticas plasmocitoides activadas crónicamente, que segregan interferones tipo I, tal como el IFN-alfa. Los autoanticuerpos también se forman contra los componentes sanguíneos celulares y conducen a anemia, trombopenia, linfopenia y neutropenia. Las infecciones virales desencadenan respuestas inmunes mediante el reconocimiento del ADN viral a través de TLR9 en los endosomas²⁹. Característicamente, los brotes de la enfermedad de SLE se asocian con un aumento de los autoanticuerpos circulantes contra el ADN bicatenario (autoanticuerpos anti-ADNbc). Recientemente se ha demostrado que los sueros de pacientes con SLE contienen inhibidores de anticuerpos y no anticuerpos que deterioran la degradación de NET por ADNasa *in vitro*³⁰, y que la falta de ADNasa extracelular se asocia con un fenotipo de SLE^{31,32}. Sin embargo, la formación de NETs en los propios pacientes con SLE o la naturaleza y cantidad de los niveles de ADN circulante (ADNmt o ADNn) en compartimentos corporales no se ha investigado en humanos. Se ha demostrado en ratones que la inhibición farmacológica de TLR9, el receptor para el ADNmt circulante, también bloquea la producción de autoanticuerpos en células B humanas de pacientes con SLE³³. La estimulación de TLR9 inducida por CpG provocó la secreción de autoanticuerpos en pacientes con enfermedad activa y en la mayoría de los pacientes en remisión clínica³³. La inhibición de MyD88 bloqueó completamente la generación de novo de células plasmáticas y la secreción de autoanticuerpos³³. De este modo, la activación dependiente de TLR9 de las células B de memoria por los patógenos podría ser uno de los mecanismos que desencadenan las recaídas en el SLE³³. De hecho, en un modelo de inflamación de la piel con SLE, los NETs se formaron de manera dependiente de TLR9³⁴. Los neutrófilos derivados de pacientes con SLE sufren muerte celular acelerada por NETosis en cultivo, siendo los NET activadores potentes de células dendríticas plasmocitoides³⁵.

Analizamos los niveles plasmáticos de ADNmt circulante en 40 pacientes con SLE (edad media 45,6 años). En pacientes con SLE, los números de copias de ADNmt, pero no los números de copias de ADNn, aumentaron significativamente en comparación con las muestras de plasma de los individuos de control (n = 26, p <0,001). El

5 número medio de copias de ADNmt en pacientes con SLE fue 1.858.317, el número mínimo de copias fue 303.000, y el número máximo de copias fue 4.543.333. De este modo, las copias de ADNmt en SLE fueron incluso mayores que las de AAV. Independientemente de la actividad de SLE, el resultado del ensayo más bajo entre todos los pacientes con SLE fue mayor que el valor más alto entre todas las muestras de control, lo que indica que los resultados del ensayo de ADNmt bajos pueden usarse para excluir el diagnóstico de SLE. Por el contrario, en la población examinada, los ensayos de ADNmt tienen una especificidad diagnóstica del 100% para esta AID.

10 Dentro del grupo de pacientes con SLE, las copias de ADNmt circulante/ml de plasma se predijeron mediante una puntuación alta del Índice de Actividad de la Enfermedad del Lupus Eritematoso Sistémico (SLEDAI), niveles bajos del componente del complemento C3, niveles altos del producto dividido del complemento C3d, y niveles altos de anticuerpos anti-ADNbc circulantes en el suero de pacientes en análisis univariado (Tabla 3). En el análisis multivariado, SLEDAI, C3d y CRP se mantuvieron significativos, lo que indica que los niveles de ADNmt son una función de la actividad de la enfermedad en el SLE (Tabla 3).

15 Cuando revertimos la pregunta y preguntamos qué actividad predice mejor la enfermedad en el SLE, según lo medido por el SLEDAI, encontramos que los niveles de ADNmt eran altamente predictivos de la actividad de la enfermedad en el análisis univariado y multivariado (Tabla 4).

Tabla 3. Predictores de los niveles de ADNmt en plasma libre de células en SLE

| | SLE (n=40) | |
|---|------------------------------|--------|
| | b (95% CI) | p |
| <i>Análisis univariado</i> | | |
| Género | | 0,692 |
| Edad del paciente (años) | | 0,788 |
| Duración de la enfermedad (años) | | 0,359 |
| SLEDAI | 95555 (48430, 142680) | <0,001 |
| C3 (g/l) | -1662563 (-3094998, -230128) | 0,024 |
| C4 (g/l) | | 0,471 |
| C3d (mg/l) | 205004 (113005, 297002) | <0,001 |
| Niveles de anticuerpos anti-ADNbc (UI/ml) | 2045 (713, 3377) | 0,004 |
| Recuento de neutrófilos sanguíneos (10 ⁹ /l) | | 0,635 |
| Creatinina sérica (mg/dl) | 559193 (40317, 1078069) | 0,035 |
| CRP sérica (mg/l) | | 0,137 |
| Proteinuria (mg/dl) | | 0,271 |
| <i>Análisis multivariado</i> | | |
| SLEDAI | 93386 (40306, 146465) | 0,002 |
| C3d (mg/l) | 136461 (40190, 232733) | 0,008 |
| CRP sérica (mg/l) | -18463 (-36498, -428) | 0,045 |

Tabla 4 Predictores de SLEDAI

| | SLE (n=40) | |
|---|---|---------|
| | b (95% CI) | p |
| <i>Análisis univariado</i> | | |
| Género | | 0,585 |
| Edad del paciente (años) | | 0,177 |
| Duración de la enfermedad (años) | | 0,846 |
| C3 (g/l) | -16,49 (-26,32, -6,66) | 0,002* |
| C4 (g/l) | | 0,195 |
| C3d (mg/l) | 1,34 (0,79, 1,88) | <0,001* |
| ELISA de anti ADNbc (UI/ml) | 0,02 (0,01, 0,03) | <0,001* |
| Recuento de neutrófilos sanguíneos (10 ⁹ /l) | 1,10 (0,10, 2,10) | 0,031* |
| Creatinina sérica (mg/dl) | | 0,223 |
| CRP sérica (mg/l) | 0,23 (0,12, 0,35) | <0,001* |
| Relación proteína/creatinina | | 0,445 |
| ADNmt (copias/ml de plasma) | 3,34e ⁻⁰⁶ (1,70e ⁻⁰⁶ , 4,99e ⁻⁰⁶) | <0,001* |
| Relación ADNmt/ADNn | 0,001 (-0,002, 0,004) | 0,557 |
| <i>Análisis multivariado</i> | | |
| ELISA de anti ADNbc (UI/ml) | 0,01 (0,005, 0,02) | 0,001 |
| ADNmt (copias/ml de plasma) | 3,24e ⁻⁰⁶ (1,85e ⁻⁰⁶ , 4,64e ⁻⁰⁶) | <0,001 |
| CRP sérica (mg/l) | 0,09 (0,01, 0,17) | 0,029 |
| Recuento de neutrófilos sanguíneos | 0,85 (0,15, 1,55) | 0,021 |

Ejemplo 3: esclerosis sistémica

5 La esclerosis sistémica (SSc, esclerodermia) es una AID grave con implicación multiorgánica. La patogénesis de SSc es poco conocida. La SSc conduce a cambios fibróticos en la piel y muchos órganos, pero ya en las primeras etapas de la enfermedad se puede detectar una microangiopatía pronunciada con activación de células endoteliales y apoptosis consecutiva³⁶. El receptor 3 de tipo Toll (TLR3) participa en la activación de las células endoteliales, y recientemente se ha demostrado que la estimulación de TLR3 activa la fibrosis dérmica^{37,38}, mientras que no se ha encontrado hasta ahora que TLR9 y los granulocitos neutrófilos tienen un papel central en la patogénesis de SSc³⁶.

10 En una pequeña cohorte de pacientes con SSc (n = 4), encontramos niveles sustancialmente elevados de ADNmt circulante en el plasma (Figura 7).

Ejemplo 4: arteritis de células gigantes (GCA)

15 La arteritis de células gigantes y la arteritis de Takayasu son AID que conducen a una inflamación de las arterias grandes. La inflamación probablemente no se origina en la luz del lecho vascular, sino más bien en la adventicia³⁹. Esto representa una diferencia importante con AAV. Otra diferencia es que, en GCA, ni los neutrófilos neutrofílicos ni TLR9 (que reconoce los ácidos nucleicos bicatenarios) desempeñan un papel importante en la patogénesis³⁹. Sin embargo, encontramos niveles sustancialmente elevados de ADNmt circulante en pacientes con GCA (Figura 8).

Ejemplo 5

Se analizaron muestras de plasma de pacientes que padecían AAV, SLE, artritis reumatoide o esclerodermia (esclerosis sistémica) para determinar la concentración de ADNmt circulante.

- 5 El análisis de ADNmt se realizó como se describe en el Ejemplo 1, excepto por la etapa de centrifugación. En todos los sujetos, se recogieron 9 ml de sangre periférica venosa en un tubo de EDTA. Inmediatamente después de la extracción de sangre, la sangre con EDTA se centrifugó a 7250 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

| ID | Enfermedad | ADNmt promedio (copias absolutas) | Desviación estándar | n |
|----|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|----|
| 1 | Personas de control sanas | 2016 | 1958 | 11 |
| 2 | AAV | 228860 | 345044 | 24 |
| 3 | SLE | 214480 | 356479 | 19 |
| 4 | Artritis reumatoide | 291943 | 925658 | 24 |
| 5 | Esclerodermia | 40977 | 36335 | 5 |

Ejemplo 6: Otra AID

- 10 También se encontró que los niveles de ADNmt circulante estaban elevados en el plasma de pacientes con síndrome de Sjögren (Figura 9) y enfermedad por depósito de cristales inflamatorios en términos de gota y pseudogota (condrocalcinosis) (Figura 10).

- 15 Además, se encontraron niveles elevados de ADNmt circulante en el plasma de pacientes que padecen enfermedad inflamatoria intestinal tal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, como se muestra en la siguiente tabla, en la que la cantidad de ADNmt se indica en números de copia absolutos por mililitro de plasma.

| ID del sujeto | Enfermedad inflamatoria del intestino | Preparación de la muestra de plasma según | Copias de ADNmt/ml de plasma |
|---------------|---------------------------------------|---|------------------------------|
| 1 | Enfermedad de Crohn | Ejemplo 1 | 283333 |
| 2 | Enfermedad de Crohn | Ejemplo 5 | 1025300 |
| 3 | Enfermedad de Crohn | Ejemplo 5 | 108150 |

Lista de referencias

1. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11:373-384.
- 20 2. Santiago-Raber ML, Baudino L, Izui S. Emerging roles of TLR7 and TLR9 in murine SLE. *J Autoimmun* 2009; 33:231-238.
3. Sun S, Rao NL, Venable J, Thurmond R, Karlsson L. TLR7/9 antagonists as therapeutics for immune-mediated inflammatory disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; 6:223-235.
- 25 4. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464:104-107.
5. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303:1532-1535.
6. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009; 16:1438-1444.
- 30 7. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 2008; 14:949-953.

8. Kallenberg CG, Heeringa P, Stegeman CA. Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:661-670.
- 5 9. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 2010; 584:3193-3197.
- 10 10. Zycinska K, Wardyn KA, Zielonka TM, Demkow U, Traburzynski MS. Chronic crusting, nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and relapse rate in pulmonary Wegener's granulomatosis. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 6:825-831.
11. Popa ER, Stegeman CA, Abdulahad WH, van der Meer B, Arends J, Manson WM, et al. Staphylococcal toxic-shock-syndrome-toxin-1 as a risk factor for disease relapse in Wegener's granulomatosis. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46:1029-1033.
12. Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CG. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994; 120:12-17.
- 15 13. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176:231-241.
14. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15:623-625.
- 20 15. Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, et al. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:222-227.
16. Margraf S, Logters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock* 2008; 30:352-358.
- 25 17. Lögters T, Paunel-Gorgulu A, Zilkens C, Altrichter J, Scholz M, Thelen S, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res* 2009; 27:1401-1407.
18. Mukhtyar C, Lee R, Brown D, Carruthers D, Dasgupta B, Dubey S, et al. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1827-1832.
- 30 19. Suppiah R, Mukhtyar C, Flossmann O, Alberici F, Baslund B, Batra R, et al. A cross-sectional study of the Birmingham Vasculitis Activity Score version 3 in systemic vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2010.
20. Setzer B, Schlesier M, Walker UA. Effects of didanosine-related depletion of mtDNA in human T lymphocytes. *J Infect Dis* 2005; 191:848-855.
21. Uehara A, Sato T, Iwashiro A, Yokota S. PR3-ANCA in Wegener's granulomatosis prime human mononuclear cells for enhanced activation via TLRs and NOD1/2. *Diagn Pathol* 2009; 4:23.
- 35 22. Pfister H, Ollert M, Frohlich LF, Quintanilla-Martinez L, Colby TV, Specks U, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* 2004; 104:1411-1418.
23. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 2004; 75:995-1000.
- 40 24. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010; 185:7413-7425.
25. Xiao H, Heeringa P, Liu Z, Huugen D, Hu P, Maeda N, et al. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am J Pathol* 2005; 167:39-45.
- 45 26. Tomasson G, Lavalley M, Tanriverdi K, Finkelman JD, Davis JC, Jr., Hoffman GS, et al. Relationship Between Markers of Platelet Activation and Inflammation with Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *J Rheumatol* 2011.
27. Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS, Ambrus JL, Velosa J, Keane WF, et al. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989; 149:2461-2465.

28. Finkelstein JD, Merkel PA, Schroeder D, Hoffman GS, Spiera R, St Clair EW, et al. Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 2007; 147:611-619.
- 5 29. Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2007; 39:1065-1067.
30. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:9813-9818.
- 10 31. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Moroy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* 2000; 25:177-181.
32. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2001; 28:313-314.
- 15 33. Capolunghi F, Rosado MM, Cascioli S, Girolami E, Bordasco S, Vivarelli M, et al. Pharmacological inhibition of TLR9 activation blocks autoantibody production in human B cells from SLE patients. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49:2281-2289.
34. Guiducci C, Tripodo C, Gong M, Sangaletti S, Colombo MP, Coffman RL, et al. Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J Exp Med* 2010; 207:2931-2942.
- 20 35. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011; 3:73ra20.
36. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009; 360:1989-2003.
37. Farina GA, York MR, Di MM, Collins CA, Meller S, Homey B, et al. Poly(I:C) drives type I IFN- and TGFbeta-mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2010; 130:2583-2593.
- 25 38. Farina G, York M, Collins C, Lafyatis R. dsRNA activation of endothelin-1 and markers of vascular activation in endothelial cells and fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2011:544-550.
39. Piggott K, Biousse V, Newman NJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Vascular damage in giant cell arteritis. *Autoimmunity* 2009; 42:596-604.

Listado de secuencias

- 30 <110> Universitätsklinikum Freiburg
- <120> Ácido nucleico mitocondrial como marcador para enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias
- <130> ZEE20101126
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Cebador
- <400> 1
- accaatagcc ctggccgtac 20
- <210> 2

ES 2 774 941 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Cebador
<400> 2
ggtagcgctt ccaattaggt 20
<210> 3
<211> 19
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 3
15 cggggctctc cagaacatc 19
<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Cebador
<400> 4
atgaccttgc ccacagcct 19

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar una enfermedad autoinmune o autoinflamatoria (AID), que comprende determinar la cantidad o concentración de ADN mitocondrial circulante (ADNmt) en una muestra de plasma de un individuo que padece la AID o se sospecha que padece la AID, y diagnosticar una AID si la concentración del ADNmt en el plasma es >150.000 copias por ml de plasma del individuo, en el que dicha AID se selecciona del grupo que consiste en vasculitis asociada a ANCA, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de Crohn.
- 10 2. Un método para monitorizar la progresión de una enfermedad autoinmune o autoinflamatoria (AID), que comprende determinar la cantidad o concentración de ADN mitocondrial circulante (ADNmt) en una muestra de plasma de un individuo que padece la AID o se sospecha que padece la AID durante un período de tiempo, y diagnosticar una AID si la concentración del ADNmt en el plasma es >150.000 copias por ml de plasma del individuo, en el que dicha AID se selecciona del grupo que consiste en vasculitis asociada a ANCA, lupus eritematoso sistémico, y enfermedad de Crohn.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad del ADNmt en la muestra de plasma se determina por PCR cuantitativa.

15

Figura 1

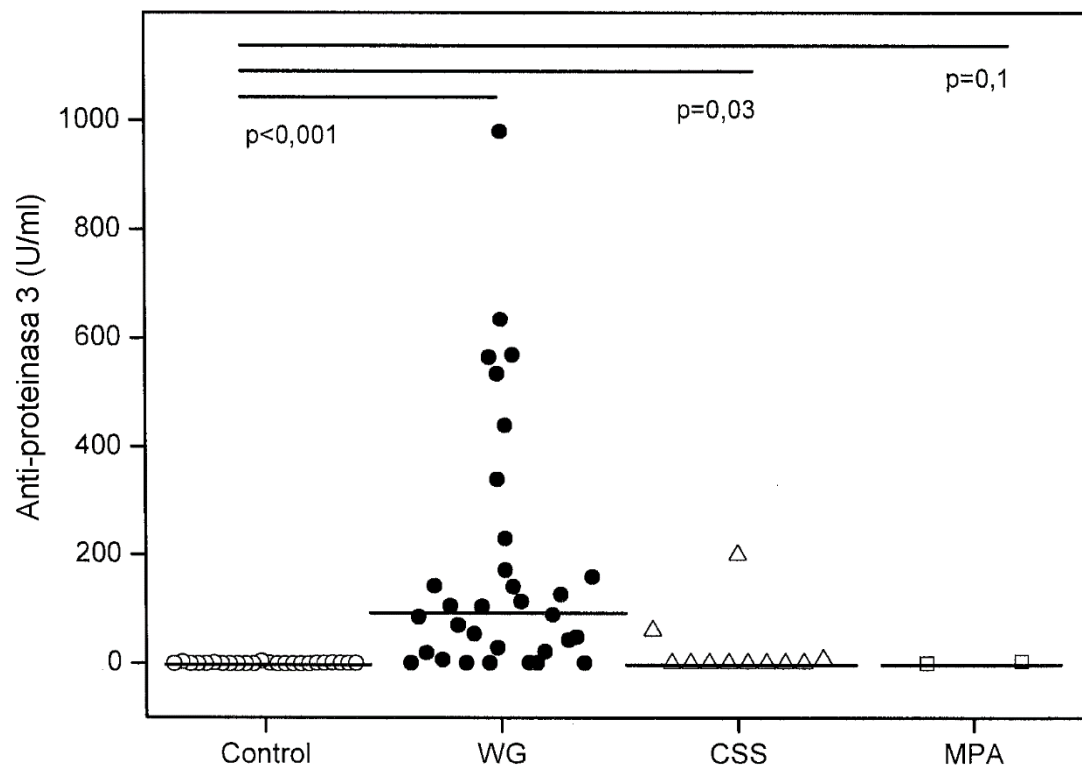


Figura 2

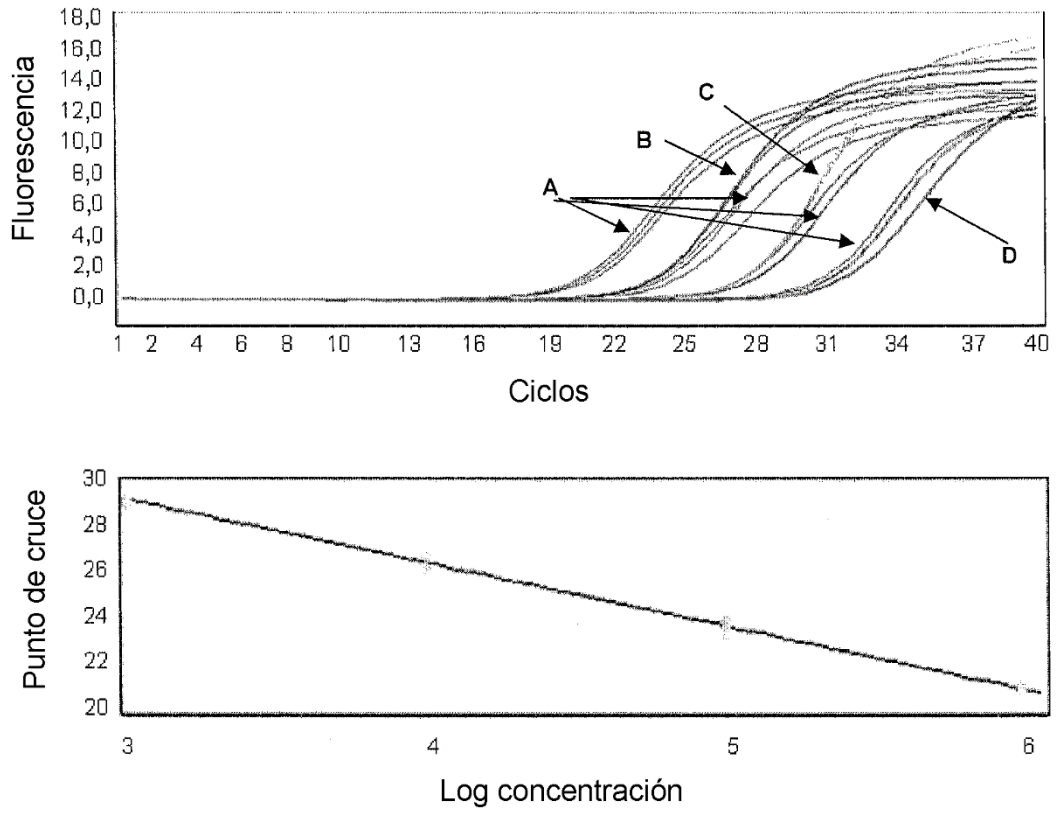


Figura 3A

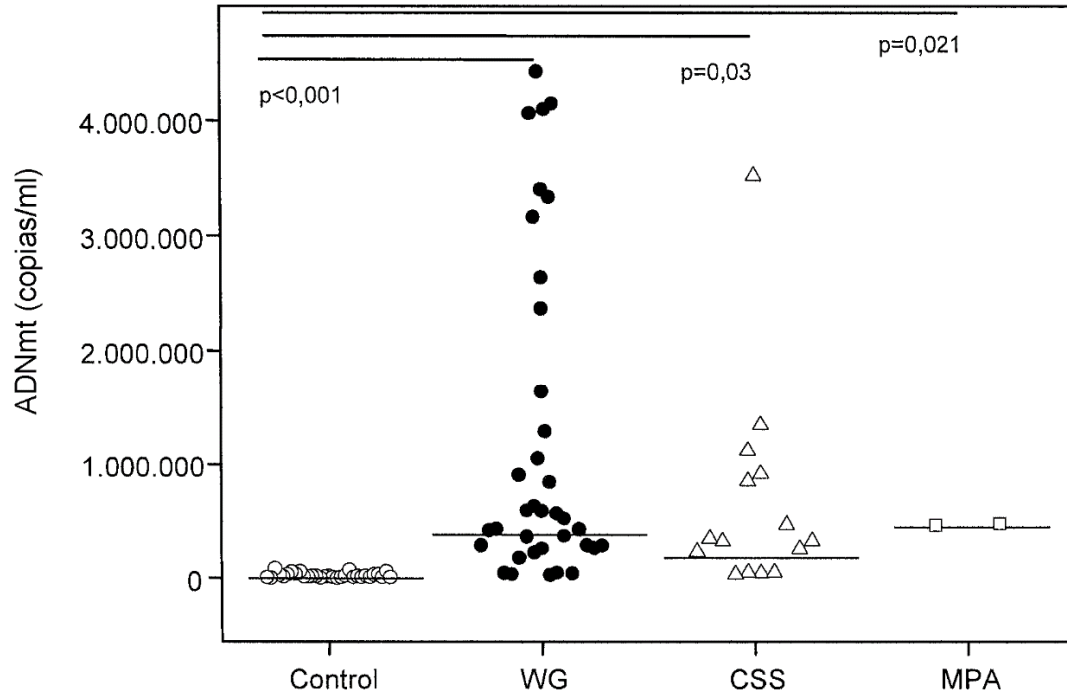


Figura 3B

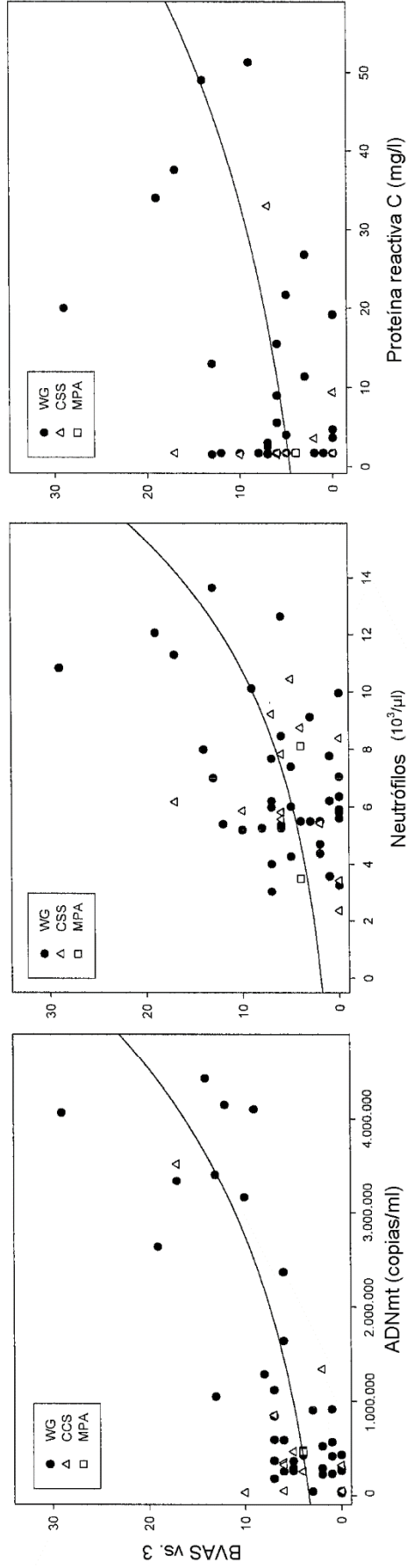


Figura 4

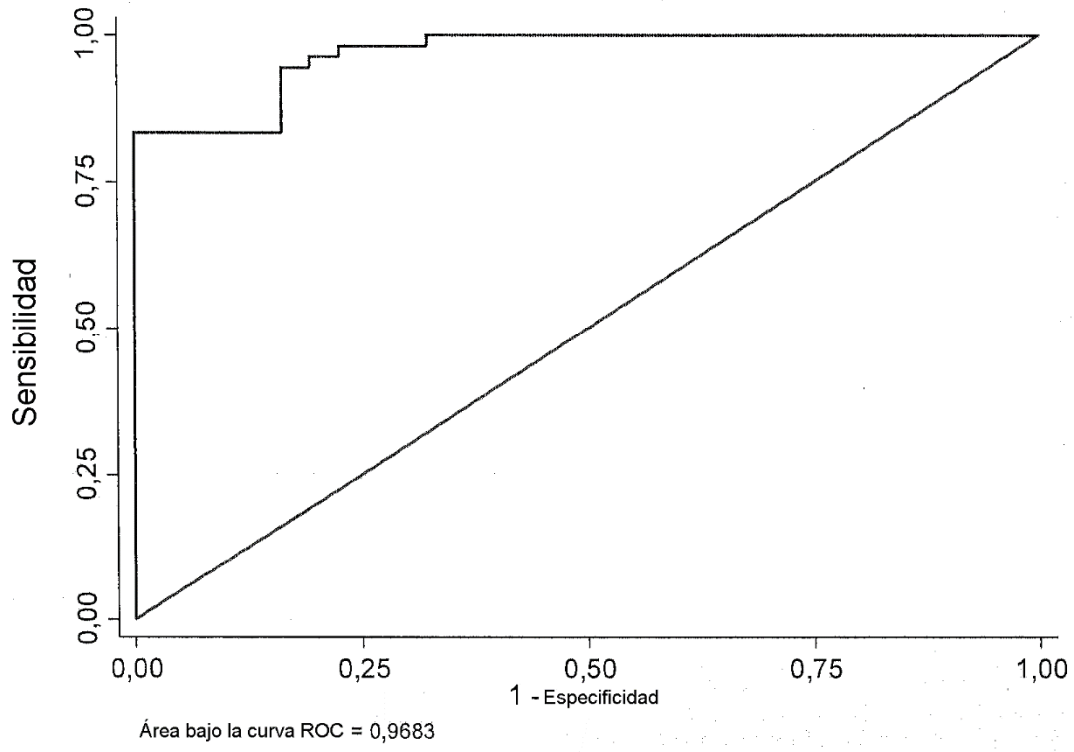


Figura 5

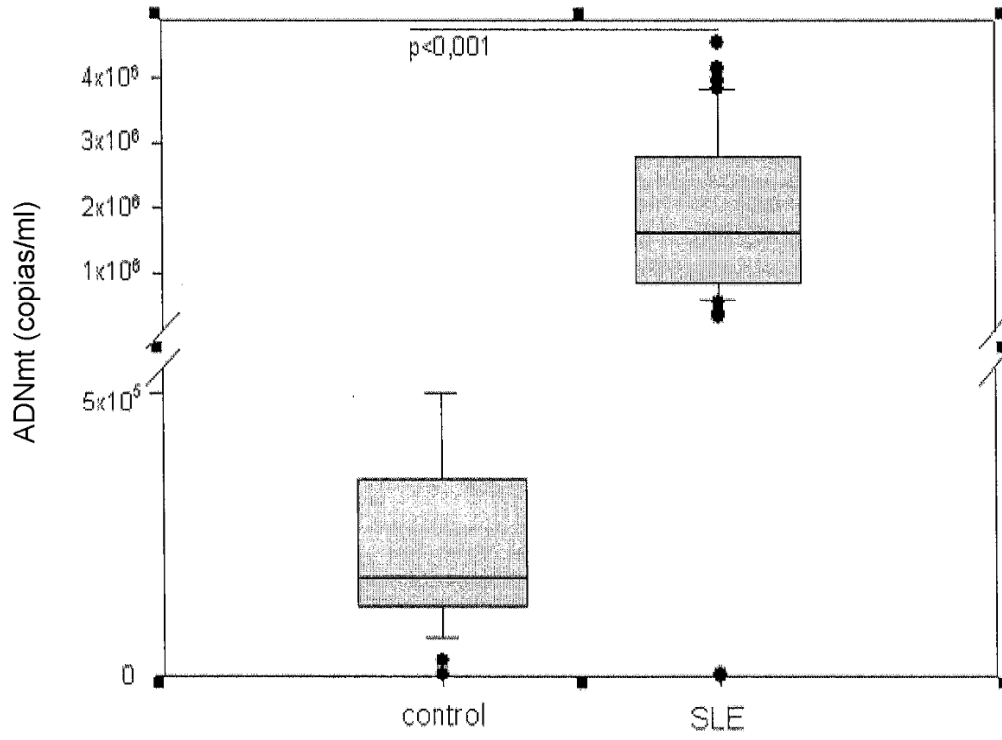


Figura 6A

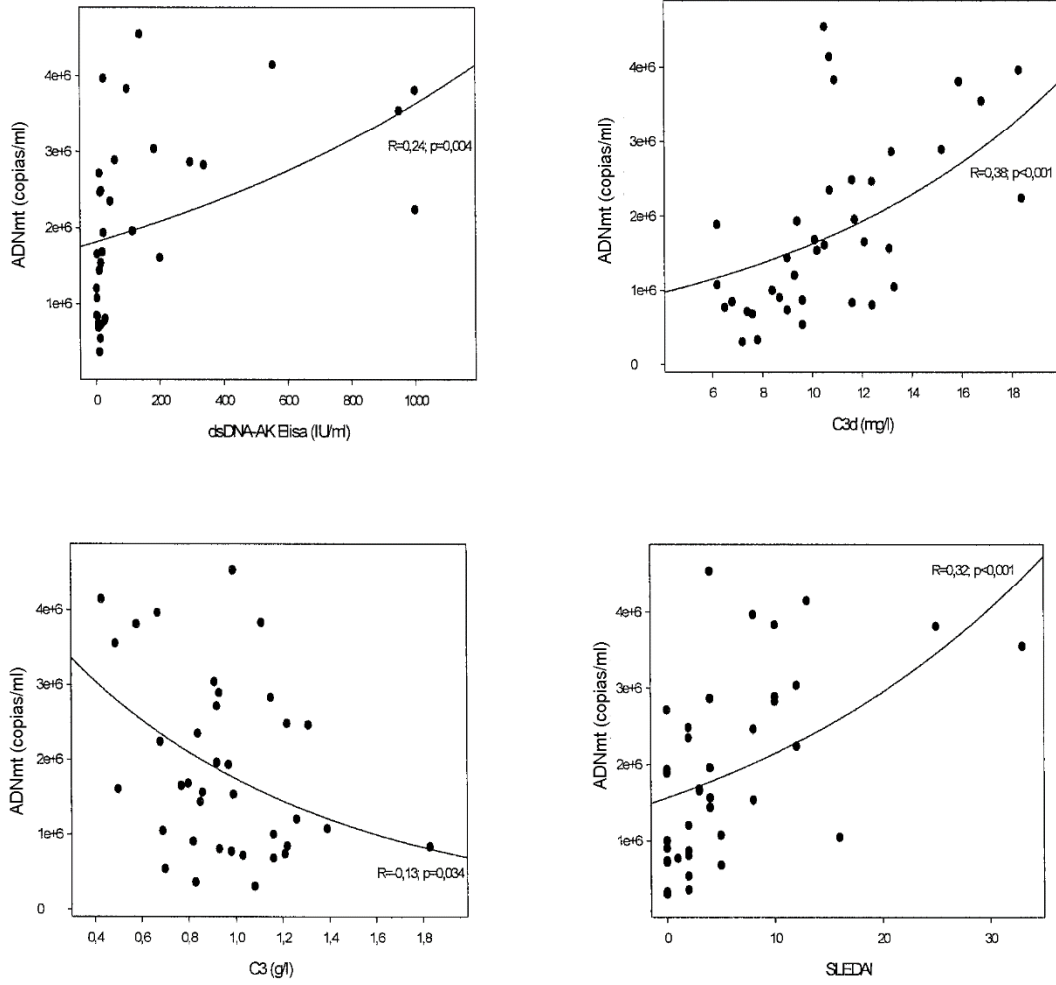


Figura 6B

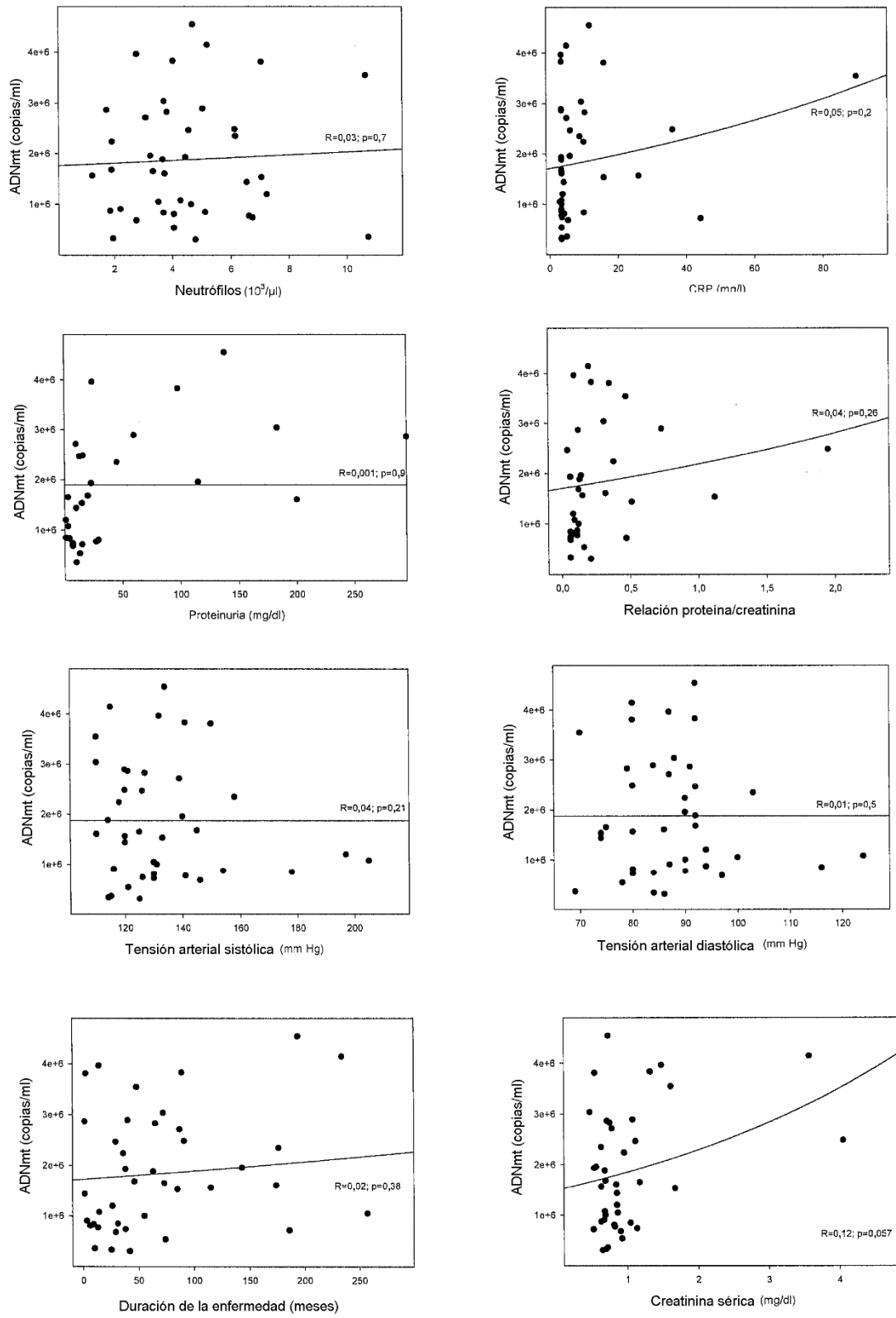


Figura 7

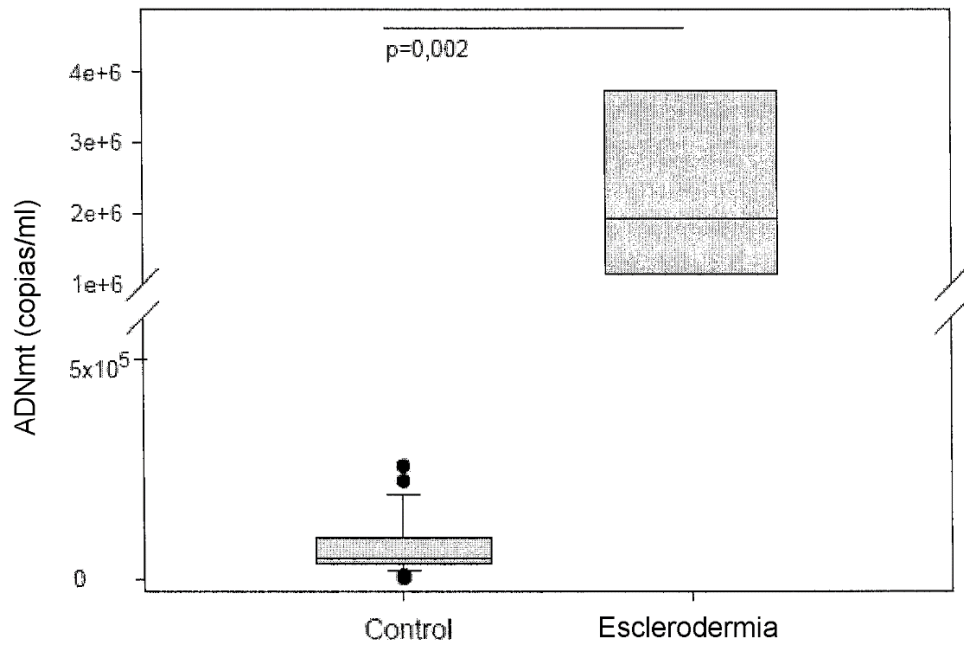


Figura 8

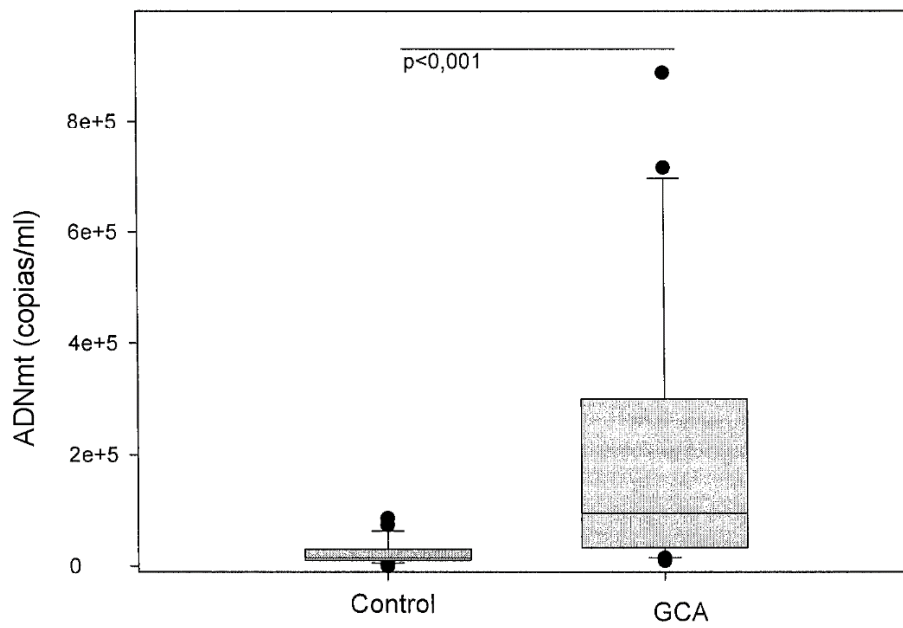


Figura 9

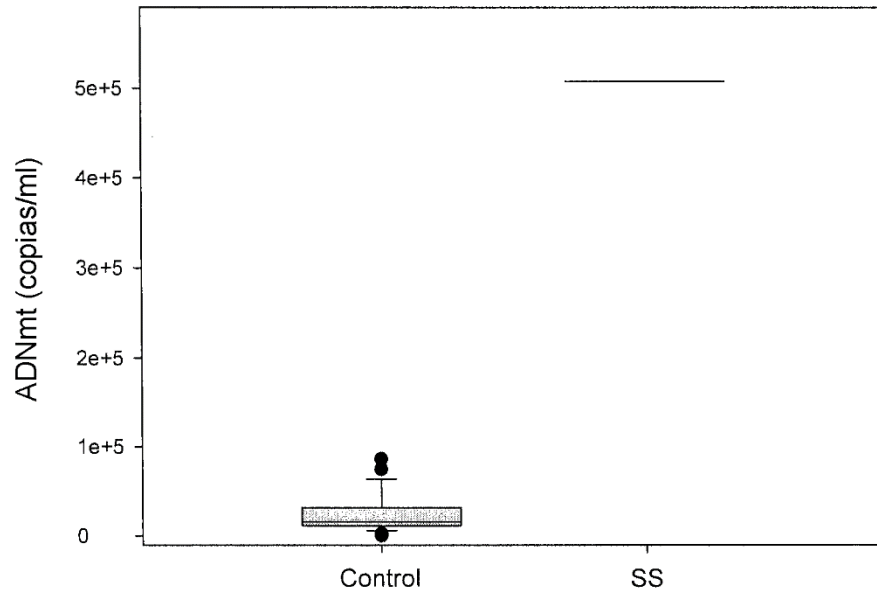


Figura 10

