

## Anticuerpos antifosfolípido en el lupus eritematoso sistémico

Alfonso López Soto

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

20

ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO  
EN EL  
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

Tesis presentada por  
**Alfonso López Soto**  
para aspirar al grado  
de Doctor en Medicina  
Mayo de 1990

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

a Gloria, por su paciencia  
a mis padres, a mi abuela

**AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. M. Ingelmo Morín, Jefe de Servicio de Medicina Interna, por su dirección en esta Tesis Doctoral y por su constante estímulo en la realización de la misma.

Al Dr. J. Font Franco, maestro y amigo, sin cuya ayuda esta Tesis no habría sido posible.

Al Prof. A. Urbano-Márquez, Jefe del Servicio de Medicina Interna General y Catedrático de Patología General, como ejemplo de dedicación a la investigación biomédica.

Al Dr. F.J. Casals Jefe del Laboratorio de Cinética Plaquetaria, así como a sus ayudantes, Sra. Antonia Guerrero, Sr. Antonio Alonso y muy especialmente al Sr. Lorenzo Alfonso, por su inestimable ayuda en la elaboración de las técnicas de laboratorio .

Al Dr. A. de La Sierra por su ayuda en el estudio estadístico y al Dr. S. Ampurdanés por su ayuda en la elaboración del material iconográfico de esta Tesis.

A todos los compañeros del Servicio de Medicina Interna y en especial al Dr. R. Cervera por sus sugerencias y colaboración en el desarrollo de esta Tesis.

A todos los pacientes que constituyen el material humano de esta Tesis.

A la Fundación Knickerbocker, por la concesión de una Beca para el desarrollo de esta Tesis.

Al fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS) y a la Comisión de Investigación Científica y Técnica (CAYCIT), por la concesión de las becas FISS 88/1155 y CAYCIT PA 86/0016.

## INDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>MOTIVACION DE LA TESIS .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISION BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1	RESEÑA HISTORICA DEL L.E.S .....	6
2.1.1	Antecedentes históricos .....	6
2.1.2	Concepto actual .....	9
2.2	EPIDEMIOLOGIA .....	13
2.2.1	Edad de inicio de los síntomas .....	16
2.2.2	Influencia del sexo y la edad .....	17
2.2.3	Familia .....	18
2.3	ETIOPATOGENIA DEL L.E.S. ....	18
2.3.1	Factores etiológicos .....	19
2.3.1.1	Factores genéticos .....	19
2.3.1.2	Factores hormonales .....	24
2.3.1.3	Factores ambientales .....	27
2.3.2	Alteraciones inmunológicas .....	31
2.3.2.1	Inmunidad humoral. Autoanticuerpos .....	31
2.3.2.2	Inmunidad celular .....	35
2.3.2.3	Sistema mononuclear fagocítico .....	36
2.3.3	Mecanismos patogénicos .....	37
2.4	LAS ALTERACIONES INMUNOLOGICAS COMO MARCADORES DE ACTIVIDAD LUPICA .....	43
2.5	ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN EL L.E.S. ....	48
2.5.1	Alteraciones del endotelio vascular .....	49
2.5.2	Alteraciones de las plaquetas .....	54
2.5.2.1	Trombocitopenia .....	54
2.5.2.2	Defectos plaquetarios cualitativos .....	56

2.5.3	Alteraciones en la coagulación .....	59
2.5.3.1	Coagulación intravascular diseminada....	60
2.5.3.2	Anticoagulantes factoriales o inactivadores .....	60
2.5.3.3	Anticoagulantes de interferencia .....	61
2.6	ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO .....	62
2.6.1	Antecedentes históricos .....	65
2.6.2	Propiedades físico-químicas e inmunológicas...	69
2.6.2.1	Anticoagulante lúpico .....	69
2.6.2.2	Anticuerpos anticardiolipina .....	70
2.6.2.3	Anticuerpos dirigidos contra otros fosfolípidos .....	72
2.6.3	Métodos de detección .....	73
2.6.3.1	Pruebas reagínicas de serología luética	73
2.6.3.2	Pruebas coagulométricas dependientes de fosfolípidos .....	74
2.6.3.3	Técnicas inmunológicas .....	75
2.6.4	Manifestaciones clínicas .....	76
2.6.4.1	Trombosis .....	77
2.6.4.2	Abortos y muertes fetales de repetición .....	79
2.6.4.3	Trombocitopenia .....	80
2.6.4.4	Afección del sistema nervioso central .....	80
2.6.4.5	Otras manifestaciones clínicas .....	82
2.6.5	Síndrome antifosfolípido primario .....	83
2.6.6	Diagnóstico del síndrome de los AAF .....	84
2.6.7	Mecanismo de acción .....	85
2.6.8	Perspectivas terapéuticas .....	94

III. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL .....	96
IV. MATERIAL Y METODO .....	101
4.1 SELECCION DE ENFERMOS .....	102
4.1.1 Grupo de enfermos con LES .....	102
4.1.1.1 Características generales .....	102
4.1.1.2 Subgrupos clínicos .....	106
4.1.1.2.1 Pacientes con trombosis .....	106
4.1.1.2.2 Pacientes con Abortos .....	107
4.1.1.2.3 Pacientes con trombocitopenia ....	108
4.1.1.2.4 Pacientes con afección del S.N.C..	108
4.1.1.2.5 Pacientes con otras manifesta- ciones clínicas .....	108
4.1.1.2.6 Pacientes con actividad clínica .....	109
4.1.2 Grupo control de personas sanas .....	109
4.2 METODOS DE LABORATORIO .....	110
4.2.1 Determinación del anticoagulante lúpico por técnicas coagulométricas .....	110
4.2.2 Detección de anticuerpos antifosfolípido específicos por técnica de ELISA .....	113
4.2.2.1 Fijación de los fosfolípidos .....	113
4.2.2.1.1 Fijación de la tromboplastina parcial	
4.2.2.1.2 Fijación de los otros fosfolí- pidos	
4.2.2.2 Bloqueo de las uniones inespe- cíficas .....	116
4.2.2.3 Unión con el suero problema .....	116
4.2.2.4 Unión con el primer anticuerpo .....	116
4.2.2.5 Unión con el segundo anticuerpo .....	117
4.4.4.6 Unión con el substrato .....	117

4.2.2.7	Lectura de las densidades ópticas .....	117
4.2.2.8	Asignación de unidades a los resultados .....	118
4.2.3	Serología luética reagínica .....	119
4.2.4	Anticuerpos anti-ADN nativo.....	119
4.2.5	Anticuerpos anti-ENA .....	119
4.2.6	Factores del complemento .....	120
4.2.7	Otras determinaciones .....	120
4.3	METODOS ESTADISTICOS .....	121
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>132</b>
5.1	ANALISIS CLINICO DE LA SERIE .....	133
5.2	ESTUDIO DE LOS AAF .....	135
5.2.1	Estandarización de las técnicas de ELISA ....	135
5.2.1.1	Fijación de los fosfolípidos .....	136
5.2.1.2	Bloqueo de las uniones inespecíficas .....	136
5.2.1.3	Unión con el suero problema .....	137
5.2.1.4	Unión con el primer anticuerpo .....	137
5.2.1.5	Unión con el segundo anticuerpo .....	137
5.2.1.6	Unión con el substrato .....	138
5.2.1.7	Lectura de las densidades ópticas .....	138
5.2.1.8	Determinación de los valores de normalidad .....	138
5.2.1.9	Coefficientes de variación intraensayo e interensayo .....	139
5.2.2	Incidencia de los distintos AAF en el LES .....	147
5.2.2.1	Incidencia del Anticoagulante lúpico .....	147

5.2.2.2	Incidencia de los Ac anti-tromboplastina .....	147
5.2.2.3	Incidencia de los Ac anti-cardiolipina.	148
5.2.2.4	Incidencia de los Ac anti-fosfatidilserina .....	148
5.2.2.5	Incidencia de los Ac anti-ácido fosfatídico .....	148
5.2.2.6	Incidencia de los Ac anti-fosfatidilinositol .....	149
5.2.2.7	Incidencia de la serología luética falsamente positiva .....	149
5.2.3	Relación entre los distintos AAF determinados por ELISA y el anticoagulante lúpico .....	153
5.2.4	Relación entre los Ac anti-tromboplastina y los otros Ac por ELISA .....	157
5.2.5	Asociaciones entre los AAF y manifestaciones clínicas y biológicas en el LES .....	161
5.2.5.1	Asociaciones con subgrupos clínicos y biológicos .....	161
5.2.5.1.1	Asociación con trombosis .....	161
5.2.5.1.2	Asociación con antecedentes de abortos .....	169
5.2.5.1.3	Asociación con trombocitopenia ...	172
5.2.5.1.4	Asociación con afección del S.N.C.	181
5.2.5.1.5	Asociación con anemia hemolítica..	181
5.2.5.1.6	Asociación con neutropenia .....	187
5.2.5.1.7	Asociación con otros subgrupos clínico-biológicos .....	191
5.2.5.1.8	Asociación con actividad clínica..	191
5.2.5.2	Asociación con otros marcadores inmunológicos .....	192
5.2.5.2.1	Asociación con los Ac anti-ADN nativo .....	192
5.2.5.2.2	Asociación con los Ac anti-ENA ...	192

5.2.5.2.3 Asociación con los factores del complemento .....	193
<b>VI. DISCUSION .....</b>	<b>194</b>
<b>VII. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>222</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>236</b>
<b>IX. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>288</b>

## PRINCIPALES ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

AAF:	anticuerpos antifosfolípido
AAN:	anticuerpos antinucleares
Ac:	anticuerpos
ACL:	anticuerpos anti-cardiolipina
ADN:	ácido desoxirribonucléico
AFA:	anticuerpos anti-ácido fosfatídico
AFI:	anticuerpos anti-fosfatidilinositol
AFS:	anticuerpos anti-fosfatidilserina
AL:	anticoagulante lúpico
ARA:	"American Rheumatism Association" (Asociación Americana de Reumatología)
ATP:	anticuerpos anti-tromboplastina
°C:	grados centígrados
CD4:	Linfocitos colaboradores
CD8:	Linfocitos supresores-citotóxicos
C <sub>3</sub> :	Factor 3 del complemento sérico
C <sub>4</sub> :	Factor 4 del complemento sérico
CH <sub>50</sub> :	Complemento hemolítico al 50%
CIC:	Complejos inmunes circulantes
DE:	Desviaciones estandard
DO:	Densidad óptica
E:	Especificidad
Ef:	Eficacia

- ELISA: "Enzyme-linked immunosorbent assay" (enzimoimmuno-  
ensayo)
- ENA: "extractable nuclear antigen" (antígenos extraíbles  
del núcleo)
- Fc: Receptor de superficie Fc de la membrana celular
- FTA-ABS: "Fluorescent treponemal antibody-absorption" (prueba  
de inmunofluorescencia indirecta de serología  
luética)
- g: Fuerza de gravedad
- HLA: Sistema mayor de histocompatibilidad
- Ig: Inmunoglobulina
- IU: Índice de unión
- KAPS: "Kinston anti-phospholipid Study" (Estudio multicéntrico  
de anticuerpos antifosfolípido)
- LES: Lupus eritematoso sistémico
- NK: "Natural killer" (linfocitos asesinos)
- ns: no significativa
- NZB: "New Zeland Black" (ratón negro de Nueva Zelanda)
- NZW: "New Zeland White" (ratón blanco de Nueva Zelanda)
- NZBW/F<sub>1</sub>: "New Zeland Black and White" (ratón híbrido de Nueva  
Zelanda)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OR: "Odds ratio"
- PAIg: "Platelet associated immunoglobulin" (inmunoglobulina  
adherida a la superficie plaquetaria)
- PGI<sub>2</sub>: prostaciclina
- PTI: Púrpura trombocitopénica idiopática

RIA: radioinmunoensayo

RNP: Ribonucleoproteína

RPR: "Rapid plasma reagin" (prueba reagínica de serología luética)

S: Sensibilidad

SLFP: Serología luética falsamente positiva

SMF: Sistema mononuclear fagocítico

SNC: Sistema nervioso central

TC: Tiempo de caolín

TITD: Tiempo de inhibición de la tromboplastina tisular diluida

TP: Tiempo de protrombina

TTPA: Tiempo de tromboplastina tisular activada

TVVRD: Tiempo del veneno de víbora de Russell diluido

TXA<sub>2</sub>: Tromboxano

VDRL: "Venereal disease reference laboratory" (prueba reagínica de serología luética)

VP+: Valor de predicción positivo

VP-: Valor de predicción negativo

VSG: Velocidad de sedimentación globular

## I. MOTIVACION DE LA TESIS

Hace ahora siete años que inicié mi formación en Medicina Interna en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona. Durante estos años, las enseñanzas más relevantes que he recibido han sido dos: la necesidad de una formación asistencial completa en el campo de la Medicina Interna y, en segundo lugar, la necesidad que tiene todo internista de profundizar, con espíritu crítico y científico, en un tema concreto de la misma.

En el primer aspecto, la formación que he recibido ha superado con creces las expectativas que tenía al empezar mi especialidad y, en este sentido, siempre estaré agradecido al Servicio de Medicina Interna del H.C.P. y, en especial, al Dr. M. Ingelmo Morín como Jefe de Servicio y al Prof. A. Urbano-Márquez como Catedrático y Jefe del Departamento Asistencial de Medicina Interna General, por su constante apoyo y estímulo en mi formación.

En el segundo aspecto, desde hace varios años formo parte del Grupo de Investigación sobre Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, del cual es Director el Dr. M. Ingelmo Morín y donde he tenido la enorme suerte de conocer al Dr. J. Font Franco, médico adjunto del Servicio y uno de los mejores especialistas nacionales en el estudio de estas enfermedades. Esta circunstancia despertó en mí el interés

por una enfermedad que incide de pleno en el campo de la Medicina Interna: el lupus eritematoso sistémico (LES). Esta entidad de etiología desconocida y patogenia incierta, puede afectar a cualquier órgano de la economía humana, por lo que se la considera como la más representativa de las enfermedades autoinmunes sistémicas.

El LES es una enfermedad caracterizada por la producción de numerosos anticuerpos dirigidos contra múltiples antígenos de las células del propio organismo. Estos autoanticuerpos tienen su origen en la disregulación del sistema inmunitario, sobre el cual actúan factores genéticos, ambientales y hormonales, que alteran tanto la inmunidad celular como la humoral.

Entre los diversos autoanticuerpos descritos en el LES, destacan los anticuerpos antifosfolípido (AAF) por el gran interés que su estudio ha despertado en los últimos años. Se caracterizan por ser un grupo heterogéneo de anticuerpos adquiridos de forma espontánea, que actúan contra estructuras fosfolipídicas de las membranas celulares. Algunos estudios clínicos han demostrado que los pacientes con LES y AAF presentan una incidencia elevada de determinadas manifestaciones clínicas.

Desde hace varios años, nuestro grupo de investigación ha centrado su interés en el estudio de los AAF en los pacientes con LES. Concretamente en el desarrollo de técnicas de laboratorio que permitan una adecuada y fácil detección de los mismos y, en el estudio de las manifestaciones clínicas asociadas a los AAF y sus posibles mecanismos patogénicos. El objeto de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en estos aspectos, en un intento de contribuir para delimitar la importancia que los AAF tienen el LES.

**II. REVISION BIBLIOGRAFICA**

## 2.1 RESEÑA HISTORICA DEL L.E.S.

### 2.1.1 Antecedentes Históricos

El lupus eritematoso sistémico (LES) ha sufrido a lo largo de los años diversas variaciones respecto a su denominación debido a un mejor conocimiento e individualización de la enfermedad (25-27).

En las primeras descripciones de la entidad, hace ya más de cinco siglos, se utilizó el término de *lupus* (lesión semejante a una mordedura de lobo) para referirse a unas ulceraciones faciales, progresivas y destructivas (Paracelso, Rogerius, Manardi). En 1833, Bielt separó estas lesiones cutáneas de otras parecidas (*lupus tuberculoso*) y creó el termino de *eritema centrífugo*, que en realidad corresponde a la forma discoide de la enfermedad.

Casi veinte años después, Hebra y Cazenave (1852) contribuyeron de forma significativa a la descripción de la enfermedad, y adoptan por vez primera la denominación de *lupus eritematoso*. Los casos estudiados por estos autores corresponden a pacientes con lesiones cutáneas discoideas, señalan el predominio de la enfermedad en el sexo femenino y describen un caso de afección articular concomitante.

Posteriormente, en 1872, Kaposi describe las lesiones cutáneas en vespertilio, características de la afección cutánea de la enfermedad e indica, la posibilidad de afección sistémica grave y, en ocasiones, con un desenlace fatal.

Simultáneamente, Jodassohn en Viena y William Osler en Baltimore, entre los años 1895 y 1904, describen las complicaciones viscerales del *eritema exudativo multiforme*, termino con el que denominan a la enfermedad, al tiempo que señalan el carácter crónico de la misma y la existencia de afección visceral en ausencia de lesiones cutáneas típicas.

En 1924, Libman y Sacks comunican la implicación cardiaca de la enfermedad y, posteriormente en 1932, Gross describe unas lesiones anatomopatológicas denominadas *cuerpos hematoxiínicos* de notable interés diagnóstico.

Baehr, Klemperer y Schifrin, en 1935, recogen una serie de casos con objeto de efectuar un análisis clínico y anatomopatológico combinado. En este estudio, que es la descripción clínica más completa aparecida hasta entonces, surge el concepto de que el LES es una enfermedad progresiva y grave, en ocasiones mortal, que afecta principalmente a las mujeres en edad fértil. Asimismo, a nivel de los glomérulos describen unas imágenes características de la

enfermedad que denominan *wire loops* (asas de alambre), según indican, y de notable valor pronóstico.

A partir de 1941 la atención de diversos investigadores se centra de forma especial sobre el LES al definir Klemperer, Pollack y Baehr el concepto de *enfermedad del colágeno*, ya que consideraban que el trastorno fundamental de estas afecciones asentaba en el tejido conjuntivo (28).

Así se llega a 1948, año en que tiene lugar un nuevo avance, tal vez el más importante en el conocimiento patogénico de la enfermedad, ya que señala la apertura de la investigación biológica del lupus. Hargraves, Richmond y Morton describen la denominada *célula LE* en la médula ósea de los paciente<sup>s</sup> afectados de lupus (29). Poco tiempo más tarde, Haserick y Bortz confirman esta observación. Posteriormente y de forma sucesiva, aparecen nuevas técnicas de laboratorio, destacando la determinación por Friou de los anticuerpos antinucleares (AAN) y de los anti-ADN, los cuales constituyen un gran avance en el diagnóstico de la enfermedad (30). También son de interés, los hallazgos en estos enfermos en los últimos años de otros muchos autoanticuerpos, como son el grupo de los anticuerpos dirigidos contra los antígenos extraíbles del núcleo (*extractable nuclear antigen*, ENA), los anticuerpos linfocitotóxicos y los antifosfolípido.

Gran parte de las investigaciones sobre el lupus en estos últimos años han estado catalizadas por las observaciones y experiencias efectuadas en el laboratorio con modelos animales, especialmente con el ratón de Nueva Zelanda y sus híbridos, que presentan unas alteraciones muy similares a las del LES humano (31). Estos estudios han permitido profundizar en la patogenia de la enfermedad y en los factores implicados en la misma. Por otro lado, estudios clínicos, biológicos, inmunológicos y epidemiológicos en amplias series de pacientes, han permitido el establecimiento de una serie de criterios para el diagnóstico de la enfermedad, asimismo han permitido el reconocimiento de la gran variabilidad de sus síntomas y pronóstico, lo que ha conducido a una nueva concepción del LES y la descripción de diversos subgrupos de enfermos (32-35).

### **2.1.2 Concepto Actual**

Pocas son las enfermedades que presentan un número tan elevado de problemas conceptuales como el LES (32), a pesar de los avances conseguidos en el conocimiento de sus mecanismos patogénéticos y en diversos aspectos del diagnóstico y del tratamiento (33). Ello se debe al desconocimiento de la etiología del proceso y a la falta de una frontera bien definida del mismo (34).

El rasgo más característico de esta entidad es la formación de numerosos y variados anticuerpos dirigidos contra las propias estructuras celulares del organismo y que están originados por la disregulación del sistema inmunitario, sobre el que actúan factores genéticos, hormonales y ambientales, que alteran sus dos vertientes, humoral y celular (6). Algunos de estos autoanticuerpos producen directamente una acción citotóxica o citolítica sobre las células del organismo (reacción de hipersensibilidad tipo II), mientras que otros forman en el torrente circulatorio complejos antígeno-anticuerpo que, al depositarse en los distintos órganos y tejidos, producirán las lesiones inflamatorias responsables de la mayoría de las manifestaciones clínicas de estos pacientes (reacción de hipersensibilidad tipo III) (36).

La clasificación del LES como una enfermedad del tejido colágeno se presta a confusiones, por lo que se considera más adecuado definirlo como un desorden inmunológico englobado dentro de las enfermedades autoinmunes (37). Como consecuencia de las alteraciones inmunológicas, las manifestaciones clínicas son múltiples y variadas, abarcando un amplio espectro clínico (25,38-41). Por todo ello y por su frecuencia, el LES ha merecido una atención especial en el campo de la Medicina Interna, hasta el punto de convertirse en una de las enfermedades sobre la

que existe un mayor número de referencias bibliográficas.

No obstante, hay autores que consideran que el LES no es una enfermedad única, sino más bien un síndrome o un conjunto de varias entidades con una etiología, fisiopatología y pronóstico diferentes, en cuyo seno se pueden separar diversos subgrupos con peculiaridades propias (5,6,42-45). Así, algunos trabajos han observado diferencias en las subpoblaciones linfocitarias entre diversos grupos de enfermos. Por ejemplo, los pacientes con nefropatía y/o trombocitopenia tienen un descenso de los linfocitos CD-4 y, en estos casos la enfermedad suele debutar antes de los 20 años; en cambio otros pacientes tienen una disminución de los CD-8 y desarrollan la enfermedad más tarde con afección multisistémica pero con una incidencia muy baja de nefropatía; finalmente aquellos pacientes con afección renal y neurológica simultáneamente, suelen tener un descenso en las dos poblaciones linfocitarias al mismo tiempo (6,45).

Otro aspecto de gran interés, es la presencia de determinados anticuerpos que se asocian de forma característica a diferentes grupos de enfermos lúpicos. En efecto, los pacientes con anticuerpos antiribonucleoproteína (Ac anti-RNP) tienen una incidencia más elevada de fenómeno de Raynaud y miositis y una escasa o nula afección renal y neurológica (46-7). Aquellos con títulos elevados de

anticuerpos anti-Sm presentan un curso clínico más grave y con predominio de fenómenos vasculíticos (48); la presencia de anticuerpos anti-La (SS B) se asocia a un mayor número de manifestaciones cutáneas y escasa incidencia de nefropatía (49); los anticuerpos anti-histonas suelen acompañar a cuadros de lupus medicamentoso o al LES con prevalencia alta de vasculitis, anemia, nefropatía y fenómeno de Raynaud, pero con escasa afección del sistema nervioso central (50); el lupus eritematoso subagudo y el LES neonatal se asocian de forma característica con los anticuerpos anti-Ro (SS A) (51-2) y, finalmente la presencia de anticuerpos antifosfolípido (AAF) se asocia a una mayor incidencia de fenómenos trombóticos, abortos de repetición y plaquetopenia (9-14).

Por último, existen otros dos modelos de enfermedad lúpica que confirman esta pluralidad de subgrupos: el LES asociado a déficit de diferentes fracciones del complemento y el denominado síndrome lúpico inducido por fármacos. En ambos modelos intervienen factores genéticos y en el último, además, un factor exógeno (42-5).

Es posible que cada uno de estos subgrupos que posean una base genética determinada, unas anomalías de la inmunoregulación propias, unos anticuerpos característicos y, en ocasiones, una etiología concreta, puedan ser

diferenciados y constituir en un futuro entidades bien individualizadas.

En conclusión, todos estos aspectos conducen en la actualidad a considerar al LES como una enfermedad inflamatoria de etiología no aclarada, aguda y crónica, con una afección multisistémica de actividad fluctuante, sujeta a frecuentes remisiones y exacerbaciones, caracterizada por la formación de múltiples autoanticuerpos como consecuencia de la disregulación del sistema inmunológico sobre el que actúan diversos factores (32-4,38-41,53-4).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

El LES no sólo ha dejado de ser una rareza clínica, sino que en la actualidad se considera una enfermedad de diagnóstico común en el medio hospitalario. Este fenómeno corre paralelo al empleo de distintas pruebas inmunológicas (AAN, anti-DNA y anti-Sm) que han permitido descubrir muchos casos benignos o atípicos, que hubieran pasado desapercibidos durante largo tiempo y que han facilitado ampliar el concepto actual del LES, así como los límites y espectro clínico de la enfermedad. Sin embargo, es posible que la incidencia real del LES sea superior a la reflejada en la literatura, debido a las dificultades que, en ocasiones plantea su diagnóstico (54).

Diversos estudios epidemiológicos señalan que la prevalencia del LES ha aumentado de forma importante en los años sesenta, siendo mayor en las mujeres americanas de raza negra. Siegel y Lee (55) revisaron extensamente la epidemiología del LES en la ciudad de New York y observaron una prevalencia de 15,5/100.000 habitantes; en un trabajo posterior realizado en 1973 por Fessel (56) en la ciudad de San Francisco, la prevalencia encontrada fue de 50/100.000. Otros autores, como Schur (70), estiman la prevalencia global en 1/400 habitantes. Un amplio estudio realizado a nivel nacional en Japón detectó una prevalencia de 18,2/100.000 habitantes (57). Christian opina que la cifra global más probable se encuentra alrededor de 10/100.000 (58). Recientemente, Hochberg (35), en Inglaterra, encuentra una prevalencia del 12,5/100.000 entre las mujeres de todas las edades, que se incrementa a 17,7/100.000 entre los 15-64 años.

La incidencia de la enfermedad está en aumento, como demuestran Wallace y Dubois en una revisión del tema (38). La incidencia calculada por Fessel (56) en San Francisco es de 7,6 casos/100.000 habitantes, resultado similar al obtenido por Nobrega (38) en el área rural de Rochester, que alcanza una cifra de 6,4/100.000. En el estudio de Siegel (55), la incidencia en mujeres negras fue de 7,9/100.000, seguido de las puertorriqueñas con 4,1/100.000 y de las

blancas con 2,5/100.000. La máxima incidencia alcanzada por las mujeres negras entre los 15 y 44 años, fue de 14/100.000. La incidencia calculada por Schur (70) se encuentre alrededor de 5/100.000 y de 1,9/100.000 en Inglaterra, según Hochberg (35).

Como se puede observar, las cifras de incidencia y prevalencia varían según las características de la población estudiada. El LES parece ser menos frecuente en Inglaterra que en Estados Unidos. En Francia es más común entre los inmigrantes de países de la ribera del Mediterráneo que entre los propios franceses. En el momento presente no existe estudio epidemiológico alguno realizado en España.

Como indican diversos autores (38,78,87), tanto la incidencia como la prevalencia se han incrementado de forma sensible. Sin embargo, este aumento en la incidencia podría ser debido a una mejor capacidad diagnóstica. El aumento en la incidencia y la prolongada supervivencia conseguida en estos enfermos mediante las nuevas medidas terapéuticas y del tratamiento de sus complicaciones, influyen en la mayor prevalencia del LES.

Respecto a la edad, existen discrepancias sobre la prevalencia de esta marcada diferencia entre uno y otro sexo en los grupos extremos de la vida. Unos autores opinan que

la proporción mujer/varón se mantiene en la edad infantil (38), mientras que en otras series se observa una reducción de la misma a valores de 2:1 y 3:1 (55).

Una situación similar se presenta en el grupo de enfermos en los que el LES comienza en edad avanzada. La mayor parte de la literatura indica que en las edades superiores a los 50 años disminuye el predominio de la enfermedad en la mujer (38,61), mientras que en otras series este hecho no se constata (59-60).

#### 2.2.1 Edad de inicio de los síntomas

En la mayoría de los pacientes la sintomatología del LES aparece entre los 15 y 25 años (38). Otras series señalan el periodo comprendido entre los 20 y 40 años como las décadas de mayor incidencia, con una edad promedio entre los 29 y 32 años. Sin embargo, el LES puede aparecer en el 10-15% de los casos en edades avanzadas. Asimismo, su inicio puede ocurrir en el 20% de los casos antes de la pubertad (55).

### 2.2.2 Influencia del sexo y la edad

En el LES, al igual que en otras enfermedades autoinmunes, se presenta con mayor frecuencia en las mujeres, lo cual queda reflejado de forma patente en todas las grandes series.

En el estudio epidemiológico más amplio realizado hasta la actualidad en América, con 1.103 casos (63), el 88% eran del sexo femenino; este porcentaje oscila entre el 78 y el 96% (38,61,63) y también se mantiene en las series españolas (64-5).

La relación mujer/varón más elevada se ha encontrado en Japón (57), donde en un estudio de 1.180 casos, la proporción fue de 11:1. En otras series se obtienen resultados entre 8:1 y 10:1 (55,66).

Varios autores han intentado hallar relaciones clínicas, analíticas y serológicas entre los grupos de LES de uno y otro sexo. Sin embargo, al no encontrar datos estadísticamente valorables, dicha circunstancia carece de utilidad tanto para el diagnóstico como para el pronóstico (64,67).

### 2.2.3 Familia

Estudios en familiares de enfermos con LES, particularmente en gemelos homocigotos, revelan una incidencia de la enfermedad superior a la esperada por el azar (38), lo que sugiere la influencia de factores hereditarios en su origen (68). No obstante, la frecuencia en familiares es baja y oscila, según las series, entre el 3 y el 8% (38,68).

## 2.3 ETIOPATOGENIA DEL LES

El rápido avance de los conocimientos en inmunología y autoinmunidad, junto a la posibilidad de estudio de un modelo experimental animal, sugieren que el LES es una enfermedad multifactorial.

El estudio de su etiopatogenia nos conduce a distinguir dos aspectos fundamentales. En primer lugar, el conocimiento de los diversos factores etiológicos y, en segundo lugar, los mecanismos patogenéticos que actúan a nivel inmunitario.

### 2.3.1 Factores Etiológicos

#### 2.3.1.1 Factores Genéticos

La influencia genética en el LES humano puede inferirse en base a la información suministrada por los estudios llevados a cabo respecto a la raza, el análisis del sistema de histocompatibilidad (HLA), la incidencia familiar y las asociaciones de deficiencias inmunitarias hereditarios y LES.

##### 2.3.1.1.1 *Raza*

Los estudios sobre la epidemiología del LES señalan una elevada prevalencia de la enfermedad entre los sujetos de raza negra, notablemente superior respecto a la blanca y en proporción menor en los puertorriqueños. Estas diferencias no son atribuibles a condiciones socioeconómicas, sino a un distinto patrimonio genético (55,70-1).

##### 2.3.1.1.2 *Sistema de Histocompatibilidad*

El estudio del sistema HLA ha ofrecido resultados variables según las distintas series (70-73). Cuando se estudiaron inicialmente los grupos HLA, A, B y C (antígenos

de clase I) en sujetos con LES, no se demostró una mayor incidencia de los mismos respecto a un grupo control. Así, el HLA-B8 estaba presente en el 29% de los pacientes y en el 21% de los controles (44).

En los últimos años se ha logrado estudiar los antígenos de la región HLA-DR (antígenos de clase II), equivalente en el hombre a la de los muridos, y que constituyen los genes encargados de la respuesta inmune. Se ha comprobado que la incidencia en el LES de dos tipos de HLA (el HLA-DR2 y HLA-DR3) es estadísticamente superior a la que se observa en la población control (44,75-6). La frecuencia de HLA-B8, detectada en estudios previos a la determinación del HLA-DR, se justifica por la estrecha asociación del HLA-B8 con el HLA-DR3, pues se heredan de forma conjunta. Asimismo, se discute el posible papel que juega el sistema HLA sobre la síntesis de autoanticuerpos; se ha citado la relación entre cifras elevadas de Ac anti-ADN y la presencia de HLA-DR3, así como de Ac anti-Ro (SS-A), y el grupo HLA-B8 y DR3 (44,70,75-7).

Las discrepancias encontradas en la literatura pueden estar ocasionadas, sobre todo, por la heterogeneidad desde el punto de vista clínico de los pacientes con LES estudiados, así como por diferencias étnicas y geográficas, por el empleo de criterios clínicos distintos y por

problemas técnicos en la tipificación de los grupos HLA secundarios a la presencia de anticuerpos anti-linfocitotóxicos (80). Otros autores sugieren que esta variación de la frecuencia de determinados antígenos del sistema HLA, en los diferentes estudios de enfermos con LES, puede ser debido a que los diversos fenotipos HLA se correlacionen con subgrupos clínicos o serológicos del LES más que con la misma enfermedad en sí.

En conclusión, puede afirmarse que existe una predisposición genética manifiesta que ejerce una influencia permisiva en el desarrollo del LES. Sin embargo, no hay una única anomalía genética común a todos los individuos con esta enfermedad, sino varias, y parece que para lograr la expresión clínica del LES se requiere la presencia de dos o más genes (44,75).

#### 2.3.1.1.3 *Estudio Familiar*

A pesar de que muchos casos de LES son esporádicos, aproximadamente entre el 5 y el 10% de los enfermos tienen familiares con la enfermedad (33,44,78). Dado el predominio de ésta en el sexo femenino, la asociación más frecuente es entre hermanas y entre hija-madre (78).

En estas familias, el estudio de los gemelos permite sospechar que la incidencia familiar de la enfermedad se debe a influencias genéticas o ambientales. A favor del factor genético están las siguientes hechos: a) mayor semejanza clínica de la enfermedad en los gemelos homocigotos que en los heterocigotos; b) en los gemelos monocigotos la frecuencia del LES es del 50-70%, mientras que en los dizigotos es similar a la de otros miembros de la familia; y c) el cuadro clínico aparece en fechas y ambientes distintos y muchas veces existen otras anomalías hereditarias ya conocidas (78-9). Por el contrario, apoyan la influencia de factores ambientales: a) la aparición de la enfermedad o de ciertos estigmas de autoinmunidad (AAN, hipergammaglobulinemia, anticuerpos antilinfocitotóxicos, factor reumatoideo, AAF) en los familiares o personas con las que conviven (78-81); y b) existe una relación temporal en el inicio del LES en los hermanos heterocigotos (82).

Los resultados obtenidos con los gemelos homocigotos apoyan la hipótesis de que la agregación familiar del LES se debe a factores genéticos más que a factores ambientales (78), si bien éstos también se encuentran presentes y no pueden desestimarse (82).

#### 2.3.1.1.4 *Déficits inmunitarios hereditarios asociados*

*Déficit de IgA:* Los déficits de IgA son frecuentes en el curso de la enfermedad lúpica. Puede tratarse de un déficit adquirido que se soluciona con la corrección de las anomalías autoinmunes, o bien hereditario, lo que podría favorecer el desarrollo del LES (38,40).

*Déficit congénito de los factores del complemento:* La herencia de ciertos déficits de factores del sistema del complemento es, con frecuencia, de tipo autosómico dominante. Varias de estas alteraciones se han asociado al LES (84). Destaca, entre ellos, el déficit de C<sub>2</sub>, que se presenta aproximadamente en el 6% de los pacientes (84). Estos enfermos suelen presentar un cuadro clínico similar al resto de sujetos con LES, aunque tienen menor incidencia de autoanticuerpos, especialmente Ac anti-ADN, y por ello menor gravedad clínica, con una nefropatía más benigna y una frecuencia mayor de afección cutánea (83). No se han efectuado estudios epidemiológicos sobre la relación del LES y déficits de otros factores del complemento, si bien por los datos publicados parece que su existencia carece de importancia al respecto; sin embargo, es difícil conocer cuando la asociación de ambos fenómenos es significativa.

Según varios autores, el déficit de alguno de los factores del complemento puede ser uno de los mayores predisponentes para el desarrollo del LES, si bien el mecanismo patogénico de este fenómeno no se conoce con exactitud (82). La teoría más atrayente es la que considera que este déficit permite la existencia de un agente infeccioso (¿virus?) o de inmunocomplejos circulantes que estimularían de forma permanente al sistema inmune, con la consiguiente síntesis de anticuerpos y, en definitiva, el desarrollo del LES (84-5).

#### 2.3.1.2 Factores Hormonales

##### 2.3.1.2.1 *Hormonas sexuales*

El papel que juegan las hormonas sexuales en el LES puede inferirse por la preponderancia del sexo femenino en esta enfermedad. Durante años no existió una explicación clara de este fenómeno, pero en la actualidad se sabe con certeza que las hormonas sexuales modulan la enfermedad lúpica. Un hecho destacado en el LES humano es que la frecuencia de mujeres afectas en edad fértil es muy superior a la de los varones. Este hecho se atribuye al importante papel patogénico de los estrógenos, y se apoya en las siguientes consideraciones: a) disminución del predominio del sexo femenino en las épocas en que no existen unos

niveles de estrógenos elevados, es decir, en la edad prepuberal y en el LES de inicio tardío (38-9,87); b) se ha descrito que los anticonceptivos orales favorecen el desarrollo de la enfermedad o pueden agravarla (86-7); c) el embarazo empeora la sintomatología cuando la paciente se encuentra en la fase activa de la enfermedad (89); y d) los enfermos con síndrome de Klinefelter (genotipo XXY) tienen una alta incidencia de LES (90). En este síndrome se produce una acción hiperestrogénica por acumulación de metabolitos activos del estradiol. Todos estos datos apoyan de forma evidente el papel de los estrógenos en la patogenia del LES humano.

Los trabajos experimentales dirigidos a identificar el factor hormonal en la trama etiopatogénica del LES se iniciaron con la observación de que los pacientes con síndrome de Klinefelter y LES asociado presentaban una estimulación estrogénica crónica por aumento de los niveles sanguíneos de estradiol (90). Estos resultados sugirieron que los enfermos lúpicos de uno y otro sexo pueden hallarse bajo una situación de hiperestrogenismo producido tal vez por alteraciones del metabolismo de esta hormona (98). Ello parece confirmarse por las experiencias de Lahita (92), que demuestran la hidroxilación anómala del estradiol a nivel del C<sup>16</sup> en los pacientes lúpicos, cuyo resultado es la acumulación de metabolitos con elevada actividad

estrogénica. El mecanismo parece residir en el aumento del número o de la actividad de las enzimas que actúan sobre la hidroxilación de los estrógenos, por razones no conocidas en la actualidad. Asimismo, parece que estas anomalías en el metabolismo del estradiol se encuentran presentes en los familiares próximos de tales enfermos (93). El estudio de los niveles de las hormonas sexuales en varones con LES ha demostrado la existencia, en la mayoría de ellos, de cifras elevadas de estrógenos en sangre y bajas de andrógenos (92).

#### 2.3.1.2.2 *Hormonas Tímicas*

Estas hormonas son un grupo de polipéptidos circulantes elaborados por el timo que tienen un papel importante en el mantenimiento de la inmunidad celular (94). También se atribuyen a estas hormonas la inducción de la capacidad de respuesta frente a mitógenos y su participación en la inmunidad antitumoral.

En sujetos jóvenes afectados de LES se han observado unos niveles anormalmente bajos de hormona tímica. Sin embargo, su variación con la actividad clínica de la enfermedad hace sospechar que no se trate de un hecho irreversible en el lupus humano. También se ha encontrado una correlación significativa entre los niveles bajos de estas hormonas y la gravedad de la nefropatía, sin que

aquellos valores se modifiquen con la terapéutica (95). Este descenso de las hormonas tímica puede intervenir en las alteraciones de los mecanismos de la inmunorregulación, que posiblemente sea el hecho fundamental en la fisiopatología del LES.

### 2.3.1.3 Factores Ambientales

Otro tipo de factores implicados en la etiología del LES son los ambientales, entre los que destacan los virus, los rayos ultravioleta y los fármacos.

#### 2.3.1.3.1 *Virus*

El hecho de que determinados virus ocasionen en el animal de experimentación una glomerulonefritis por inmunocomplejos y que induzcan la síntesis de anticuerpos antinucleares ha sido el estímulo esencial de la investigación sobre la implicación de los virus en la etiología del LES (96).

La evidencia de la etiología vírica en el hombre es menos convincente que en el lupus murino, de hecho, los resultados obtenidos son muy contradictorios (98). Existen datos indirectos, como los estudios epidemiológicos, que hacen sospechar la intervención de un agente infeccioso. En

estos estudios, además de un factor genético evidente, se observa la presencia de anticuerpos antinucleares en familiares no consanguíneos. También recientemente se ha descrito la presencia de anticuerpos antilinfocitotóxicos en estos familiares y en el personal de laboratorio en contacto con suero de enfermos lúpicos (44,80-1,99). Tales anomalías solo se presentan a nivel serológico y no tienen traducción clínica, pero sugieren la posibilidad de transmisión infecciosa.

El hallazgo en 1969, de unas estructuras tubulares en las biopsias renales de enfermos lúpicos hizo sospechar la incriminación vírica en la enfermedad, pues se interpretaron inicialmente como nucleocápsides de paramixovirus (97). Con posterioridad se observó que se trataba de estructuras alteradas del retículo endoplásmico, presentes en numerosas infecciones por virus. Estudios recientes señalan que el interferón induce la formación de estas estructuras en los linfocitos en cultivo.

Con el fin de investigar el papel de los virus en el desarrollo del LES, otros autores han determinado en sangre los títulos de anticuerpos antivirales, y han observado la elevación de los mismos frente a la rubéola, citomegalovirus y herpes simple, entre otros. Sin embargo, estos hallazgos pueden ser la consecuencia de una

reactividad policlonal de los linfocitos B más que la respuesta específica a la infección por estos virus (100).

Los hipotéticos mecanismos de acción de los virus en el LES se basan en las observaciones de las alteraciones que produce en el hombre la infección vírica, alguna de las cuales son muy similares a las observadas en el LES: inmunocomplejos formados por virus, antígenos virales o neoantígenos; reacciones citotóxicas dirigidas contra el virus o antígenos víricos situados en las células infectadas; activación policlonal de los linfocitos B; reacciones inmunocelulares que afectan a las subpoblaciones de linfocitos T y cambios a nivel de los receptores de superficie celular (100).

#### 2.3.1.3.2 *Rayos Ultravioleta*

Otro factor ambiental que puede intervenir en la etiopatogénia del LES son los rayos ultravioleta de la luz solar. Muchos pacientes con LES tienen fotosensibilidad y la exposición solar o el tratamiento con RUV puede inducir lesiones cutáneas o exacerbar la enfermedad (33,101). Trabajos experimentales indican que alrededor del 30% de los enfermos lúpicos tienen anticuerpos reactivos contra el ADN irradiado con RUV, lo que es argumento a favor del papel de los rayos ultravioleta en el desarrollo del LES (101).

### 2.3.1.3.3 *Fármacos*

Numerosas sustancias pueden inducir en el hombre un síndrome clínico similar al LES (*LES-like*) y la formación de anticuerpos. Sin embargo, existen diferencias entre la enfermedad idiopática y la inducida por estos fármacos respecto a la raza, edad, sexo, órganos afectados y tipo de autoanticuerpos (102-3).

Los más estudiados y mejor conocidos son la hidralacina, quinidina y la procainamida. Posiblemente, el factor patogénético más importante en el desarrollo de estos síndromes *LES-like* se debe al fenotipo acetilador de los enfermos. Ello es particularmente importante en el caso de la hidralacina, que desencadena cuadros lúpicos con mayor frecuencia en los individuos acetiladores lentos. Asimismo, se ha encontrado asociado de forma significativa el HLA-DR4 en individuos que presentaron un cuadro *LES-like* por hidralacina. La distribución de antígenos HLA de clase II en estos pacientes difiere de los enfermos con LES idiopático, lo que hace sospechar que se trate de dos entidades distintas (103).

El mecanismo por el que dichos fármacos pueden inducir la enfermedad es oscuro. Se ha invocado una interacción o reactividad cruzada entre tales medicamentos y los antígenos nucleares, principalmente el ADN, que daría lugar a una modificación de sus características y lo convertiría en antigénico, aunque no puede descartarse la activación de un virus, o bien una acción a nivel de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, cuyo resultado sería una disminución de las supresoras que favorecería la síntesis de autoanticuerpos por los linfocitos B (102-3).

### 2.3.2 Alteraciones Inmunológicas

En la patogenia del LES tiene un papel primordial la alteración del sistema inmunitario. Numerosos estudios han demostrado que en esta enfermedad la respuesta inmunológica tanto humoral como celular está alterada (3,104).

#### 2.3.2.1 Inmunidad humoral. Autoanticuerpos

A nivel de los linfocitos B existe una hiperreactividad, la cual hoy en día se considera debida principalmente a dos fenómenos: 1) la presencia de una disregulación en las subpoblaciones de los linfocitos T, con una disminución de los linfocitos supresores-citotóxicos

(CD8) que favorece la acción de los linfocitos colaboradores (CD4) sobre los linfocitos B, y 2) la existencia de una hiperreactividad propia de los linfocitos B. Esta hiperreactividad de los linfocitos B conduce a una producción aumentada de autoanticuerpos reactivos frente a determinados autoantígenos (3,104). Los autoanticuerpos más estudiados en el LES son los AAN, antimembrana celular y recientemente los anticuerpos antifosfolípido, motivo central de esta tesis doctoral.

#### 2.3.2.1.1 *Anticuerpos antinucleares*

Los AAN constituyen el marcador más característico del LES, reaccionan frente a diferentes antígenos nucleares de diversa naturaleza (ADN nativo, ADN desnaturalizado, diversas nucleoproteínas, histonas, etc.) (tabla I).

**Tabla 1.- Anticuerpos antinucleares**

- Células LE
- Anticuerpos anti-ADN nativo
- Anticuerpos anti-ADN desnaturalizado
- Anticuerpos anti-ENA:
  - Ac anti-Ro
  - Ac anti-La
  - Ac anti-Sm
  - Ac anti-RNP
  - Ac anti-Ma
  - Ac anti-PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*)
  - Ac anti-Su
- Anticuerpos anti-histonas

Fueron los primeros autoanticuerpos descritos y son los responsables de la formación de las células LE. Estas células han sido la primera prueba biológica diagnóstica del LES y continúan como uno de los criterios diagnósticos considerados por la Asociación Americana de Reumatología (*American Rheumatism Association, ARA*) (105-6).

#### 2.3.2.1.2 *Anticuerpos antimembrana celular*

Dentro de este grupo hay descritos anticuerpos anti-eritrocitos, anti-plaqueta (38) y, de descubrimiento más reciente los antilinfocitarios o linfocitotóxicos (107-8).

Estos anticuerpos linfocitotóxicos estarían dirigidos contra diversas subpoblaciones linfocitarias, por ejemplo contra los linfocitos supresores-citotóxicos (CD8), y producirían las anomalías en los mecanismos de regulación inmunológica propias de los individuos lúpicos. Son anticuerpos de naturaleza heterogénea, principalmente de clase IgM, que precisan de *in vitro* de la acción del complemento para producir su acción citolítica, que es máxima a temperaturas bajas (4°C, 15°C, 22°C). Posteriormente se ha observado que pueden actuar por un mecanismo llamado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, que no requiere el concurso del complemento y que se realiza óptimamente a 37°C. Este segundo tipo de anticuerpo linfocitotóxico es de tipo IgG (107-8).

### 2.3.2.1.3 *Anticuerpos antifosfolípido*

Estos anticuerpos están dirigidos contra estructuras fosfolipídicas de las membranas celulares. Su asociación con alteraciones de la hemostasia, fundamentalmente fenómenos trombóticos y plaquetopenia, ha hecho crecer en los últimos años el interés por su estudio. Las características de estos anticuerpos se revisan con detalle en un capítulo posterior.

### 2.3.2.2 Inmunidad Celular

Se ha demostrado que los linfocitos T están disminuidos de forma selectiva en los enfermos lúpicos. Además, diversos trabajos han encontrado un déficit en la actividad supresora y citotóxica medida *in vitro*, especialmente en la fase activa de la enfermedad (3,109). También existe una respuesta disminuida frente a la fitohemaglutinina y de la concavalina A, mitógenos que inducen la proliferación de la población T (3,110).

Diferentes autores (111-113) han observado en el LES una alteración de la actividad citotóxica de los linfocitos líticos naturales (*natural killer*, NK), especialmente en enfermos en fase activa. No es una alteración permanente sino que puede variar durante la evolución de la enfermedad en un mismo individuo. Se necesitan más estudios para saber

si el descenso de actividad de los linfocitos NK favorece el desarrollo de un enfermedad más activa o si simplemente traduce un estado de disregulación inmunológica generalizado. La importancia de estas anomalías no es bien conocido. El déficit de actividad de los linfocitos NK podría aumentar la susceptibilidad a infecciones víricas, también podría impedir la destrucción de clones de linfocitos anómalos, portadores de antígenos alterados y provocadores de la síntesis de autoanticuerpos.

#### 2.3.2.3 Sistema mononuclear fagocítico (SMF)

También han sido detectadas en el LES alteraciones del SMF (compuesto por macrófagos, principalmente esplénicos y células de Kupffer hepáticas) que tienen una función importante en la eliminación de los CIC del sistema vascular (35-6,114). En el animal de experimentación se ha observado que el bloqueo o saturación del SMF retrasa el aclaramiento sanguíneo de los CIC, situación que facilita su deposición en el glomérulo renal (37). Por ello es posible que los pacientes con LES, con manifestaciones clínicas que parecen secundarias al depósito de inmunocomplejos, presenten una alteración a nivel del SMF que posibilite este depósito por una inadecuada depuración de los CIC en la sangre (114).

En el LES humano, a pesar de que el aclaramiento parece es normal, se han detectado alteraciones en el SMF utilizando hematíes autólogos sensibilizados con IgG. Esta disfunción se relaciona con el receptor Fc y va ligada a la actividad de la enfermedad (35-6,114-15).

### 2.3.3 Mecanismos Patogénicos

El análisis de todos estos factores etiológicos y de las alteraciones inmunológicas que convergen en el LES permiten afirmar que, a pesar de que no haya una respuesta satisfactoria para todas las cuestiones acerca de la etiopatogénia de esta enfermedad, se han conseguido avances considerables merced a la posibilidad de estudiar modelos experimentales animales y al mejor conocimiento del sistema inmunológico.

Numerosos trabajos a nivel experimental y humano señalan que la enfermedad es multifactorial, con una base genética asociada a diversos factores endógenos y exógenos, diferentes de un individuo a otro y que son los que facilitan la expresión del LES. Es posible que más de uno de estos factores sean necesarios para desarrollar la enfermedad.

En general, hay un acuerdo unánime en afirmar que, tanto en el LES murino como en el humano, existe una activación policlonal de los linfocitos B que conduce a la producción de autoanticuerpos y posteriormente a la lesión tisular. La causa inicial no se conoce pero se considera que esta activación de los linfocitos B está ocasionada por una anomalía propia de estos linfocitos y/o por una alteración de los linfocitos T supresores-citotóxicos secundaria a la existencia de anticuerpos linfocitotóxicos producidos por los propios linfocitos B.

Las vías patogénicas son diferentes según las hipótesis de los autores. Steinberg (2), en el año 1979, sugirió los siguientes factores patogénicos: predisposición genética a una estimulación excesiva de los linfocitos B (por una anomalía primaria de estas células o del control que sobre ellas ejercen los linfocitos T) y respuesta excesiva genéticamente determinada frente antígenos linfocitarios y nucleares. Este estadio de hiperestimulación hacia los linfocitos y los antígenos nucleares permite la expansión de las diferentes clonas de linfocitos B capaces de producir anticuerpos contra estos antígenos. Se sintetizan preferentemente anticuerpos linfocitotóxicos y AAN, especialmente anti-ADN. Estos AAN producen alteraciones a través de la formación de CIC responsables de las lesiones hísticas. Los anticuerpos linfocitotóxicos , dirigidos



fundamentalmente contra los linfocitos T inmaduros, pueden facilitar la eliminación de los linfocitos T reguladores, en especial de los T supresores-citotóxicos. El resultado final es la manifestación clínica de la enfermedad, hipergammaglobulinemia, síntesis de autoanticuerpos y disminución de la actividad supresora, desarrollándose un círculo vicioso. Diversos agentes infecciosos podrían actuar como activadores policlonales de los linfocitos B y, en consecuencia, ser un estímulo para la producción de anticuerpos linfocitotóxicos y AAN. Según Hahn (1980) (33) en el LES se produce una combinación de factores ambientales, genéticos y hormonales (esencialmente hormonas sexuales) que conllevan a una disminución de la función supresora y a una hiperreactividad de los linfocitos B que, a su vez, provocan una producción aumentada de autoanticuerpos, entre los que se encuentran los linfocitotóxicos, que contribuyen a la disminución de la función supresora-citotóxica. De esta forma se cierra el círculo vicioso y se perpetua la actividad de la enfermedad.

Meyer, Margulis y Kahn (1983) (40) han postulado que, bajo la influencia combinada de factores genéticos y posiblemente extrínsecos (radiaciones ultravioleta, virus, fármacos) el funcionalismo tímico está alterado y, por lo tanto, se desencadena un aumento de la síntesis de anticuerpos por falta de control de los linfocitos T sobre

los B, los que por si mismos ya se encuentran activados.

Morrow, Younou, Isenberg y Snaith (1983) (4) por su parte, consideran que en el LES, tanto humano como murino, hay diversas anomalías inmunológicas: hipocomplementemia, CIC, autoanticuerpos. A nivel celular existen alteraciones en los linfocitos B, aumentadas por la disminución de la acción de los linfocitos T supresores-citotóxicos a causa de los anticuerpos linfocitotóxicos. Al mismo tiempo, la acción alterada de los linfocitos NK y los macrófagos amplifican el proceso patológico.

Por último, Tsokos (1987) (116) considera que los factores genéticos, ambientales y hormonales influyen en la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Posteriormente algunos de estos anticuerpos pueden producir un daño tisular directo, mientras que otros pueden ejecutar una retroregulación sobre los linfocitos T inmunoreguladores, sobre la formación de CIC o sobre la activación del sistema del complemento (figura 1).

De todos estos estudios se pueden extraer dos conclusiones fundamentales respecto a la etiopatogénia del LES:

1. Las reacciones inmunes determinan, sino toda, sí una buena parte de la expresión del LES.

2. Existen factores dependientes del individuo (incluido el sexo y la variación genética) y factores externos que predisponen a la iniciación y reactivación de la enfermedad, y tal vez es necesario la concurrencia de más de uno de estos factores.

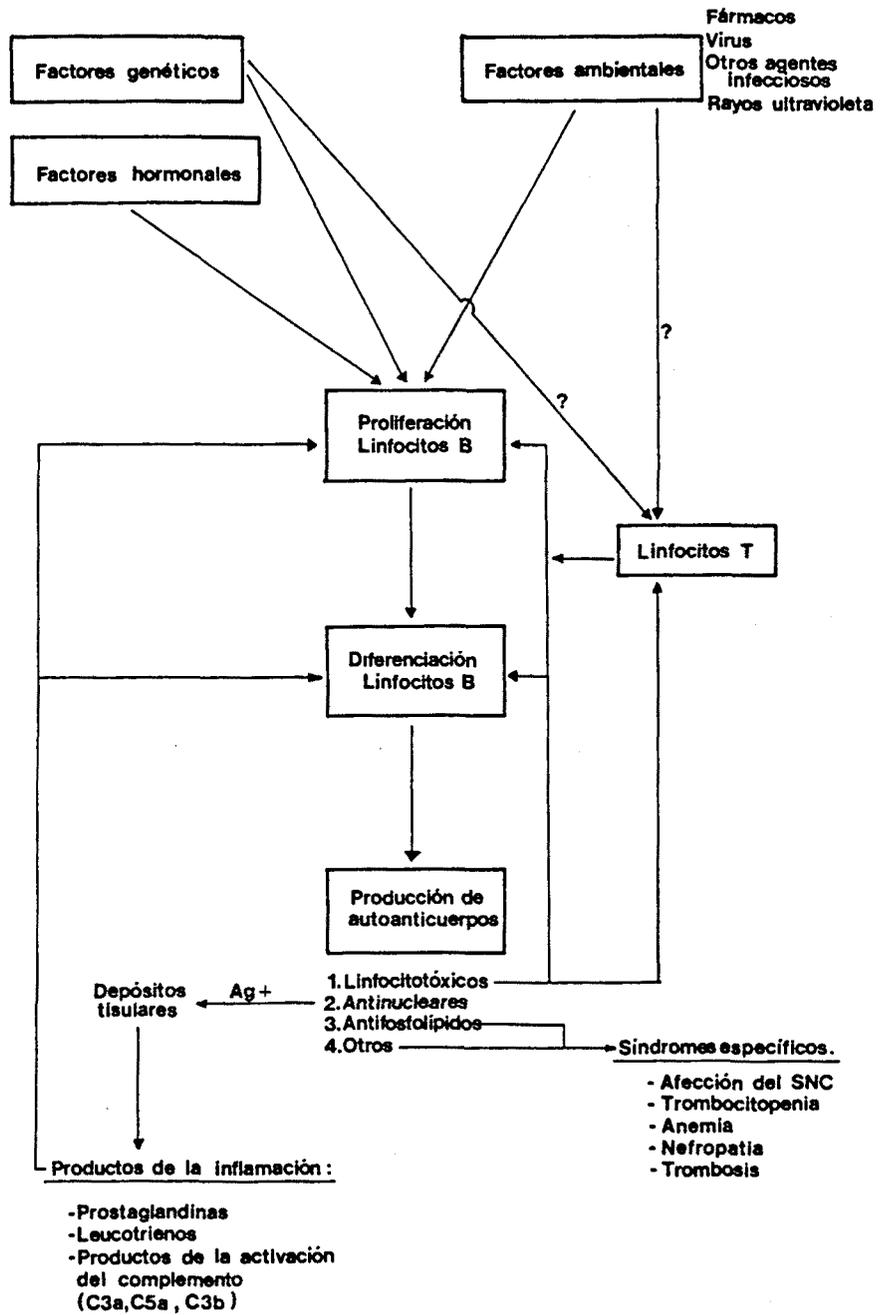


Figura 1. Mecanismos patogenicos en el LES

## 2.4 LAS ALTERACIONES INMUNOLOGICAS COMO MARCADORES DE ACTIVIDAD LUPICA

Algunas de las diversas alteraciones inmunológicas halladas en el LES y que son su base etiopatogénica pueden detectarse fácilmente en el laboratorio y son de gran utilidad en la detección y en el control de la actividad lúpica. No obstante, el valor de los diversos parámetros inmunológicos es un tema debatido por la existencia de resultados contradictorios. La prueba de laboratorio óptima debe reunir las siguientes características: precisión en el diagnóstico de actividad (es decir, un grado elevado de especificidad y sensibilidad), identificación del órgano específico afectado y valor predictivo de recurrencia de la enfermedad o pronóstico. Entre las diversas pruebas de laboratorio empleadas en la detección de actividad lúpica destacan la determinación de los Ac anti-ADN nativo, factores del complemento ( $C_3$ ,  $C_4$ ,  $CH_{50}$ ), CIC, VSG, recuento linfocitario y plaquetario, inmunoglobulinas y beta-2 microglobulina (122,124-31). Recientemente, algunos autores (16) consideran también que determinados AAF (concretamente los ACL) pueden ser marcadores de actividad lúpica. No obstante, hasta el momento actual no se conoce ninguna prueba de laboratorio aislada que sea capaz de discriminar completamente entre la presencia y la ausencia de actividad clínica.

Algunos autores han encontrado que existe una correlación entre la actividad lúpica y los niveles de diversos AAN específicos, como son los Ac anti-ADN nativo y los anti-Sm. En cambio, otros han observado que pueden existir pacientes con niveles elevados de Ac anti-ADN sin presentar actividad clínica. Probablemente, estas contradicciones reflejan la dificultad en definir la actividad clínica y el hecho de que pueden ser órganos muy diferentes los que se encuentren afectados. En este sentido, Morrow et al. (121) han encontrado que los Ac anti-ADN nativo eran útiles para distinguir las formas activas de las menos activas fundamentalmente en aquellos enfermos con afección articular, renal y cutánea (128-29).

Por lo que respecta a los factores del complemento, Morrow (121) también observó que el descenso de  $C_3$  y  $C_4$  tenía muy poca utilidad para distinguir el grado de actividad, mientras que el descenso del  $CH_{50}$  era un buen marcador de actividad. También encontró que el descenso del  $C_3$  era útil como indicador de afección renal severa, mientras que no era así para el  $C_4$  y el  $CH_{50}$ . Otros autores, en cambio, no han corroborado estos hallazgos.

En los últimos años ha habido una controversia importante sobre el valor de los CIC en el LES. Utilizando tres técnicas distintas, algunos autores (117) encontraron

que eran buenos marcadores de actividad en pacientes con afección fundamentalmente renal. Otros trabajos (119-20), en cambio no encontraron ninguna correlación empleando un ensayo en fase líquida. No obstante, Abrass encontró una relación significativa cuando empleaba un ensayo en fase sólida. Estas discrepancias se pueden explicar por las diferencias patogénicas de los CIC, las cuales son determinadas por el tamaño de los diferentes anticuerpos que los componen. Morrow et al (121), empleando una técnica de RIA en fase sólida, encontraron que existía una correlación entre los CIC y la actividad clínica únicamente en el caso de afección articular. De forma parecida, algunos autores (118,122) han encontrado una asociación entre los CIC y la afección sinovial en la artritis reumatoide. Además, se han observado diferencias sensibles en los niveles de los CIC en respuesta a diversos estímulos fisiológicos, lo que justifica la necesidad de tomar las muestras bajo unas condiciones uniformes.

La VSG es considerada por algunos autores, como Morrow (121) como un buen marcador de actividad, mientras que Hughes et al (69) considera lo contrario.

La linfopenia también es reconocida por diversos investigadores como un buen parámetro de actividad lúpica severa y moderada. Aunque este hecho debe ser tomado con

reservas, ya que los pacientes con afección severa suelen recibir dosis altas de corticoides y la linfopenia puede ser un fenómeno yatrogénico.

En los enfermos con trombocitopenia, la cifra de plaquetas no se correlaciona con la severidad de afección lúpica en otros territorios, por lo que el recuento plaquetario no se valora como un buen indicador del estado clínico del LES.

Actualmente se considera que es necesaria la determinación de diversos parámetros inmunológicos para valorar el grado de actividad de la enfermedad. La mayoría de autores opina que los títulos elevados de Ac anti-ADN nativo y el descenso del  $CH_{50}$  son los marcadores más sensibles y específicos de actividad lúpica.

La nefropatía y las infecciones son las principales causas de muerte en los enfermos con LES. Por lo tanto, la utilización de marcadores biológicos para determinar la evolución de la lesión renal y el desarrollo de una infección es de máxima importancia. La afección del sistema nervioso central se asocia con una elevada morbilidad pero baja mortalidad, hecho que se ha vuelto frecuente debido a la mayor supervivencia de los enfermos con LES (136). El diagnóstico y el pronóstico de la afección neurológica no

se puede evaluar adecuadamente empleando las técnicas de laboratorio actuales.

La incidencia del LES parece haber aumentado en los últimos 25 años, a pesar de lo cual la enfermedad tiene actualmente un mejor pronóstico. El reconocimiento de formas benignas de LES, el tratamiento precoz de la nefropatía en fases iniciales y el uso de corticoides, fármacos inmunosupresores y de antibióticos son responsables en gran parte de esta mejoría en el pronóstico. En cambio, los avances en la evaluación biológica del LES establecido han llegado a un punto estacionario. El valor de las pruebas de laboratorio se relaciona directamente con la eficacia de los regímenes terapéuticos, los cuales no se han modificado significativamente en los últimos 10 años. Además, los progresos en el campo del laboratorio permitirán clarificar los mecanismos patogénicos y mejorar las modalidades terapéuticas. En cambio, el diagnóstico de laboratorio del LES asintomático puede tener un potencial beneficio para los individuos con un elevado riesgo de desarrollo de la enfermedad y este constituye un importante campo de investigación futura (133-39).

## 2.5 ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN EL LES

La hemostasia es el conjunto de mecanismos fisiológicos a través de los cuales se consigue controlar los procesos hemorrágicos y mantener la fluidez de la sangre circulante. Las alteraciones de estos mecanismos conducen a la aparición de hemorragias o de fenómenos trombóticos (140).

La presencia de alteraciones en la hemostasia en los enfermos con LES es conocida desde las primeras descripciones por Conley y Hartmann (141) en el año 1952 en dos enfermos lúpicos con fenómenos hemorrágicos que tenían un anticoagulante circulante. Durante los últimos años el interés que inicialmente despertaron los fenómenos hemorrágicos se ha dirigido hacia el estudio de los procesos trombóticos, circunstancia que se ha vuelto más patente desde que sabemos que el AL predispone a las trombosis (9-14).

La importancia clínica de los fenómenos trombóticos en el LES fue destacada inicialmente en el año 1980 por Gladman y Urowitz (142). Estos autores siguieron durante siete años un grupo de 180 pacientes y observaron que 17 de ellos habían presentado un total de 21 episodios de trombosis venosas, algunas de ellas complicadas con

tromboembolismos pulmonares. Cinco de los pacientes murieron durante el periodo de seguimiento y en todos ellos las embolias pulmonares habían jugado un papel importante. Estos autores concluyeron que los fenómenos trombóticos se presentaban en el 9% de los enfermos con LES y, además, eran una fuente importante de morbilidad y mortalidad. Otros autores posteriormente han publicado incidencias similares, que oscilan entre el 4.6% en la serie de Dubois (143) con 520 pacientes y el 14% en la de Moore y Lutz con 21 (204).

Las alteraciones de la hemostasia en el LES, tanto sí se manifiestan con hemorragias como con fenómenos trombóticos, son el resultado de la interacción de tres sistemas: 1) el endotelio vascular, 2) las plaquetas y 3) el sistema de la coagulación (203).

#### **2.5.1 Alteraciones del endotelio vascular**

La vasculitis crónica de pequeño vaso es un hallazgo prominente en el LES. Su patogenia se considera relacionada con el daño sobre las células endoteliales producido por los CIC o por autoanticuerpos, entre los cuales estarían los AAF. Teóricamente, esta lesión endotelial puede producir el depósito de fibrina y la formación de trombosis localizadas, con la consiguiente activación local de los mecanismos fibrinolíticos.

Para demostrar esta hipótesis, diversos investigadores han estudiado la actividad fibrinolítica sanguínea en los enfermos con LES. Habitualmente esto se ha efectuado a través de la cuantificación de los productos de degradación de la fibrina y del fibrinógeno, con resultados muy variables. Canesi et al (145), cuantificaron el aclaramiento de fibrinógeno en el plasma de 51 pacientes con diversos procesos del tejido conectivo. Estos autores objetivaron que el aclaramiento del fibrinógeno y, por tanto, su consumo se encontraban aumentados en todos los pacientes, comparado con un grupo control. En los enfermos con LES este aumento se correlacionaba con los niveles de Ac anti-ADN y los factores del complemento. De la misma manera, el mayor aclaramiento de fibrinógeno se encontraba en los pacientes con actividad clínica y nefropatía lúpica. Estos resultados dan soporte al concepto de que la coagulopatía de consumo es un mecanismo patogénico en las enfermedades del tejido conectivo.

Por otro lado, Hardin et al (146), mediante la cuantificación de los productos de degradación del fibrinógeno, encontraron que los niveles de fibrinopéptido A se hallaban elevados en todos los pacientes con actividad clínica, en cambio, eran normales en la mayoría de los pacientes en remisión. El aumento del fibrinopéptido A también se correlacionaba con el número de órganos afectados,

sugiriendo una asociación directa entre la activación de la coagulación y el grado de actividad clínica del LES. Los estudios recientes de Font et al (147) han confirmado parcialmente estos hallazgos.

El papel desarrollado por el tejido vasculítico en la activación de la coagulación y la fibrinólisis se puede demostrar más directamente por la medición de la actividad fibrinolítica local a nivel de la piel. Utilizando una técnica de determinación del activador del plasminógeno, Dodman et al (148), en el año 1973, cuantificaron la actividad fibrinolítica cutánea de 32 sujetos normales y 28 pacientes con vasculitis cutánea. Esta se encontraba disminuida en los enfermos con vasculitis, tanto en la piel afecta como en la sana. Sun et al (149) obtuvieron unos resultados similares en 12 pacientes, 10 de los cuales tenían una vasculitis sistémica. Demostraron también por medio de inmunofluorescencia la presencia de inmunoglobulinas y de factores del complemento en los vasos de la piel afecta y en la sana, lo que sugería el depósito de inmunocomplejos. Estos autores postularon que la actividad fibrinolítica disminuida localmente era el resultado del aumento de la activación de los mecanismos de la coagulación y fibrinólisis, con la consiguiente deplección local del activador del plasminógeno en el endotelio.

Más evidencia sobre la participación de los factores endoteliales en el desarrollo de los fenómenos trombóticos en el LES son los aportados por los estudios de Angles-Cano et al (150). Estos autores analizaron 28 pacientes con LES, cinco de los cuales habían presentado fenómenos trombóticos. En todos los enfermos, la actividad fibrinolítica era normal, incluido el tiempo de lisis de la euglobulina. No obstante, dieciséis de ellos, no presentaban el descenso esperado en el tiempo de lisis de la euglobulina después de una oclusión venosa, lo que sugería un fallo en el activador del plasminógeno. Resulta interesante el hallazgo que la deficiencia del activador del plasminógeno ha sido observado en otras enfermedades con complicaciones tromboembólicas, como son la enfermedad de Behçet, las trombosis venosas idiopáticas y recurrentes y las vasculitis. Otro hallazgo de este estudio fue que en 20 de los 28 pacientes con LES tenían niveles elevados de factor VIII en sangre y que había una correlación significativa entre este hecho y la ausencia de respuesta a la oclusión venosa. De forma similar, no queda claro que los niveles aumentados de factor VIII predispongan a la trombosis, pero este hecho también se encuentra en otras situaciones complicadas con tromboembolismos, como son las enfermedades hepáticas, la diabetes y el embarazo. Como el factor VIII y el activador del plasminógeno son sintetizados por las células endoteliales, es posible que la predisposición a la

trombosis sea debida a una alteración en el endotelio vascular.

En los últimos años ha crecido el interés por el papel que desempeñan las prostaglandinas en los fenómenos trombóticos, fundamentalmente la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ). Esta es sintetizada por las células endoteliales y parece ser la contrapartida del tromboxano ( $\text{TXA}_2$ ) en la regulación de la agregación plaquetaria *in vivo*. La  $\text{PGI}_2$  es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y, a través del estímulo constante de las plaquetas, protege probablemente la pared vascular contra el depósito de agregados plaquetarios. Esta sustancia inhibe la agregación plaquetaria a concentraciones más bajas de las que se necesitan para inhibir la adhesión plaquetaria y protege de esta forma las paredes vasculares sin la formación de trombosis. Se ha sugerido la presencia de alteraciones en el balance de la  $\text{PGI}_2$  en los enfermos con púrpura trombótica trombocitopénica (151), enfermedad que tiene muchas características en común con el LES. Asimismo, algunos autores han detectado un defecto en la liberación de  $\text{PGI}_2$  asociado a la presencia del AL y trombosis recurrentes (152).

Finalmente, Byron et al (153) después de estudiar en 73 pacientes con LES la presencia del AL, diversas proteínas fibrinolíticas (fibrinógeno, plasminógeno, antitrombina III, activador del fibrinógeno) considera que existen evidencias notables de lesión endotelial en el LES, pero ninguna de las proteínas fibrinolíticas estudiadas se correlaciona con la presencia clínica de trombosis, mientras que sí que hay una correlación entre estas y la existencia del AL. En consecuencia, los responsables, entre otros, de la lesión de las células endoteliales podrían ser los AAF.

## 2.5.2 Alteraciones de las plaquetas

### 2.5.2.1 Trombocitopenia

La presencia de trombocitopenia se ha descrito hasta en el 50% de los pacientes con LES y se considera la manifestación principal en aproximadamente el 15% de los casos. Suele ser moderada, mientras que la trombocitopenia severa con cifras de plaquetas inferiores a  $3 \cdot 10^9$ /litro es poco frecuente (154). Se considera que la trombocitopenia es debida a una disminución de la vida media de las plaquetas como consecuencia de la acción de anticuerpos antiplaquetarios, de forma parecida a lo que sucede en la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI). No obstante, hay diversas incógnitas respecto a la naturaleza y el mecanismo

de acción de estos anticuerpos. Así, empleando la cuantificación del factor plaquetario 3 (FP3) se han detectado anticuerpos antiplaquetarios en casi el 80% de los enfermos con LES y, en cambio, la trombocitopenia aparece en un porcentaje más bajo (154). Karpatkin et al (155) postularon en el año 1972 que en el LES existiría un estado de trombocitosis compensada. Ello parecía confirmarse por el hallazgo de un tiempo de vida media plaquetaria acortado en los pocos enfermos que estos autores estudiaron y, al encontrarse un aumento de los megatrombocitos en la sangre periférica de los enfermos con LES, lo que sugería un aumento de la trombopoyesis.

Este concepto de trombocitosis compensada, aceptado durante muchos años, fue rechazado por Bergström et al 1980 (156). Estos autores encontraron que no habían diferencias significativas en la vida media plaquetaria entre un grupo control, enfermos lúpicos no tratados y enfermos lúpicos tratados, excepto sí se acompañaban de una franca trombocitopenia. Además, no existían diferencias en la producción de plaquetas entre estos grupos. Los autores concluyeron que en el LES no existe un estado de trombocitosis compensada y también consideraron inadecuada la técnica de cuantificación del FP3 para detectar anticuerpos antiplaquetarios.

Recientemente se han desarrollado técnicas más específicas para la detección de anticuerpos antiplaquetarios, como son la determinación de serotonina plaquetaria liberada y, fundamentalmente, técnicas inmunológicas de detección de inmunoglobulinas adheridas a la superficie plaquetaria (*platelet associated immunoglobulin*, PAIg). Los estudios de Howe y Lynch (157) han demostrado que las PAIg de los enfermos con LES se unen a las PAIg de los enfermos con PTI. Asimismo, Rauch et al (158) postulan que mientras los anticuerpos antiplaquetarios en la PTI van dirigidos contra glicoproteínas plaquetarias específicas, los del LES son más heterogéneos y pueden ir dirigidos contra proteínas, ADN o fosfolípidos presentes en la membrana plaquetaria. Esto explicaría la asociación encontrada por algunos autores (9) en el LES entre trombocitopenia y niveles elevados de Ac anti-ADN o AAF. En consecuencia, subgrupos de Ac anti-ADN y AAF se comportarían como anticuerpos antiplaquetarios y serían los responsables de la trombocitopenia presente en el LES.

#### 2.5.2.2 Defectos plaquetarios cualitativos

El funcionalismo plaquetario ha sido estudiado por numerosos investigadores con resultados variables. Regan, Lackner y Karpatkin (159) estudiaron 21 pacientes con LES y encontraron un descenso en la respuesta a la agregación

al colágeno, adenosínfosfato (ADP) y adrenalina en 12 (57%). Esta hipoagregabilidad es idéntica a la observada tras la ingesta de aspirina, pero ninguno de aquellos pacientes la había tomado ni ningún otro fármaco capaz de alterar el funcionalismo plaquetario durante los diez días de la prueba. La alteración del funcionalismo plaquetario parecía correlacionarse con la actividad de la enfermedad, y no con la presencia de anticuerpos antiplaquetarios. De forma interesante, cuando las fracciones de las globulinas de los enfermos se mezclaban con plasma normal rico en plaquetas, se encontró un factor capaz de inhibir la agregación plaquetaria en tres de ellos con funcionalismo plaquetario normal. Hallazgos similares se han observado en pacientes con PTI (151). Otros autores no han confirmado la hipoagregabilidad plaquetaria en el LES y en el estudio de Angles-Cano et al (150) no se encontraron alteraciones plaquetarias funcionales en los 28 pacientes con LES estudiados. La imposibilidad de encontrar una alteración plaquetaria funcional consistente, podría estar relacionada con el hecho de que en las pruebas *in vitro* se utiliza un estímulo no fisiológico y resulta interesante la descripción de Zahavi y Marder (160) de la enfermedad de depósitos plaquetarios, en la que demostró una hipoagregabilidad plaquetaria en un paciente que presentaba múltiples episodios trombóticos.

Hay un gran número de mecanismos inmunológicos que pueden intervenir en el LES y promover la activación plaquetaria, predisponiendo a las trombosis. Desde hace años se sabe que los CIC pueden inducir la agregación plaquetaria, con liberación de factores como la serotonina y la histamina (161). Los CIC también pueden activar el sistema del complemento, el cual, por sus efectos sobre los basófilos y los mastocitos, promueve la secreción por estas células del factor activador plaquetario. Además, algunos de los factores del complemento, por ellos mismos pueden activar las plaquetas directamente. La evidencia de la existencia de una activación plaquetaria continua proceden de la observación que en el LES las plaquetas circulantes tienen reducidas las concentraciones de serotonina intracelular (162). Aunque este fenómeno ha sido estudiado principalmente asociado a la nefritis, la activación plaquetaria se cree que sucede en el torrente circulatorio y no *in situ* en el riñón. Ha habido un gran interés en el posible papel de los mecanismos de la coagulación en la patogenesis de la glomerulonefritis por CIC y, particularmente, en la participación de las plaquetas como mediadoras del daño celular (163).

### 2.5.3 Alteraciones en la coagulación

El sistema de la coagulación es el encargado en último término de la gelificación de la sangre gracias a la conversión de una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno, en otra insoluble, la fibrina, la cual constituye la base del coágulo sanguíneo. El paso del fibrinógeno a fibrina requiere la participación de una enzima proteolítica llamada trombina. La conversión de la protrombina en trombina tiene lugar gracias a la acción de un grupo de factores, también con actividad proteolítica, llamado complejo protrombinasa o complejo activador de la protrombina, constituido por los factores X y V activados, calcio y fosfolípidos plaquetarios (164). La activación del factor X se efectúa en el organismo por dos vías o mecanismos: la vía intrínseca y la extrínseca. Todos estos acontecimientos constituyen la denominada cascada de la coagulación (141). Los estudios en los enfermos con LES han detectado diversas alteraciones de esta cascada que pueden resumirse en la existencia de: 1) síndrome de coagulación intravascular diseminada, 2) anticoagulantes antifactoriales o inactivadores, y 3) anticoagulantes de interferencia. Este último grupo está constituido por los AAF.

### 2.5.3.1 Coagulación intravascular diseminada

La CID o coagulopatía de consumo es un trastorno en el cual se activan los mecanismos de la coagulación, se depositan fibrina y plaquetas en los vasos sanguíneos y existe una tendencia a las hemorragias. Esta CID, localizada o difusa, se atribuye a los CIC y/o sustancias similares a la tromboplastina (*thromboplastin-like*) (165-68).

Los CIC presentes en el plasma de los enfermos con LES activan el sistema de contacto de la coagulación y, de otro lado, lesionan el endotelio vascular por su capacidad de activar el complemento y las cininas. La toxicidad celular detectada en los enfermos lúpicos da lugar a la liberación de sustancias similares a la tromboplastina que son capaces de activar la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. A pesar de la existencia de estos dos factores, la CID es muy infrecuente en los enfermos con LES (168) y tampoco ha sido demostrada su presencia en la mayoría de los enfermos lúpicos con trombosis (150).

### 2.5.3.2 Anticoagulantes factoriales o inactivadores

Los anticoagulantes factoriales o inactivadores son inmunoglobulinas plasmáticas que actúan como anticoagulantes circulantes frente a determinados factores de la

coagulación. En los enfermos con LES se han descrito anticoagulantes contra los factores XII, XI, IX, VIII-C, VIII-Ag y II (169-73). Su presencia ha sido detectada en algunos pacientes asociada a trombosis (171-72). Con todo esto, estos anticoagulantes constituyen una rareza y, además, en amplias series de enfermos con LES y trombosis no se ha detectado ningún caso (174-75), por lo que algunos autores dudan de su existencia.

#### 2.5.3.3 Anticoagulantes de interferencia

Los anticoagulantes de interferencia son también inmunoglobulinas plasmáticas que actúan como anticoagulantes circulantes, interfiriendo en la interacción de diversos factores entre sí a nivel del complejo de la protrombinasa. Este grupo está constituido por los AAF (9-14).

## 2.6 ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO

Entre los diversos autoanticuerpos descritos en el LES, los AAF destacan por el interés creciente que durante los últimos años esta asumiendo su estudio. Los AAF son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos adquiridos de forma espontánea, que se caracterizan por ir dirigidos contra estructuras fosfolipídicas de las membranas celulares (9-14). Aunque el LES es la entidad en la que se ha observado una mayor incidencia de estos anticuerpos, también se han descrito en otras entidades de tipo autoinmune, en ocasiones como manifestación inicial; en infecciones; neoplasias ; incluso, en personas aparentemente sanas (190-91). Recientemente se ha descrito su asociación en enfermos afectos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (193) (Tabla 2).

Su detección se efectuaba clásicamente mediante diversas técnicas coagulométricas (tiempo de cefalina, de caolín, etc), que ponen de manifiesto de forma indirecta la presencia de anticuerpos dirigidos contra la fracción fosfolipídica del complejo activador de la protrombina y que reciben el nombre genérico de anticoagulante lúpico (AL) (141,154,176-79,209). Otro método clásico, también indirecto, consiste en la detección de la serología luética falsamente positiva (SLFP) mediante técnicas reagínicas

TABLA 2. Enfermedades en las cuales se han detectado AAF.

## 1. INMUNOLOGICAS:

Lupus eritematoso sistémico  
Síndrome lúpico inducido por fármacos  
Enfermedad mixta del tejido conectivo  
Dermatomiositis  
Enfermedad de Behçet  
Síndrome de Sjögren  
Anemia hemolítica autoinmune  
Tiroiditis de Hashimoto  
Púrpura trombocitopénica idiopática  
Miastenia gravis  
Vasculitis  
Síndrome antifosfolípido primario

## 2. INFECCIOSAS

Mononucleosis infecciosa  
Lepra  
Tuberculosis  
Sífilis  
Rickettsiosis  
SIDA

## 3. NEOPLASICAS

Mieloma múltiple  
Enfermedad de Hodgkin  
Linfomas no Hodgkinianos  
Carcinomas (colon, cervix, próstata)

## 4. OTRAS ENFERMEDADES

Ateroesclerosis  
Mielofibrosis  
Diabetes Mellitus  
Linfedema congénito  
Condromalacia  
Enfermedad de Degos  
Enfermedad de Von Willebrand  
Síndrome de Guillain-Barré

## 5. PERSONAS APARENTEMENTE SANAS

(VDRL, RPR) que indican la existencia de anticuerpos dirigidos contra una mezcla de cardiolipina, lecitina y colesterol (211-12). No obstante, en los últimos años se han descrito diversas técnicas para la detección directa de AAF (radioinmunoensayo, ELISA) que han permitido el reconocimiento de anticuerpos contra la cardiolipina (ACL) (23,182). Su presencia en la sangre de pacientes que presentan fenómenos trombóticos, abortos o muertes fetales de repetición (14,191) y diversas alteraciones hematológicas (trombocitopenia, anemia hemolítica) (11,204,274-75) y neurológicas (mielopatía transversa, corea, migraña) (11) ha hecho considerar a diversos autores la posibilidad que los AAF participen directa o indirectamente en la etiopatogenia de estos procesos. Estos hechos han motivado la reciente definición del denominado *síndrome de los AAF* o *síndrome antifosfolípido*, con la finalidad de incluir en él a aquellos pacientes que presentan las mencionadas manifestaciones clínicas asociadas a la existencia de AAF (405-8).

En esta revisión bibliográfica se comentan los antecedentes históricos de este síndrome, las principales características bioquímicas e inmunológicas de los AAF, los métodos de laboratorio para su detección, las manifestaciones clínicas asociadas, los criterios diagnósticos propuestos, los mecanismos fisiopatológicos

postulados y, por último, las recomendaciones terapéuticas actuales.

### 2.6.1 Antecedentes históricos

La primera comunicación de un AL se atribuye a Conley y Hartman (141), los cuales lo describieron en 1952 en dos pacientes afectados de LES con diátesis hemorrágica. Es probable, no obstante, que este anticoagulante hubiera sido descrito previamente por Aggeler et al (189), en el año 1946, en un enfermo con púrpura trombocitopénica complicada con trombosis. Otros autores (154,177-79) confirmaron la existencia de este anticoagulante al observar que producía *in vitro* un alargamiento de las pruebas de coagulación, como el tiempo de cefalina y el tiempo de protrombina. Este anticoagulante fue denominado lúpico por Feinstein y Rapaport (177), por el hecho de haber sido descrito originariamente en enfermos con LES.

Si bien las primeras descripciones del AL fueron hechas en pacientes que presentaban hemorragias (141), muy pronto se observó que éstas eran infrecuentes en los enfermos que presentaban este anticoagulante y sólo aparecían si concomitantemente presentaban otras alteraciones de la hemostasia, como trombocitopenia intensa o algún déficit en los factores de la coagulación. Entonces

se consideró al como otro de los autoanticuerpos del LES, pero sin ningún significado clínico aparente. No obstante, en los últimos años su estudio ha recobrado un notable interés al comprobarse que existe una asociación muy marcada entre su presencia y la existencia de trombosis, abortos de repetición y trombocitopenia (9-14).

Como se desprende de los comentarios anteriores, el término AL en sí es erróneo, ya que, como hemos comentado, clínicamente no produce hemorragias ni tampoco es específico del LES. Aunque sigue aplicándose hoy en día por razones históricas y en consideración que es un AAF que se comporta *in vitro* como anticoagulante al prolongar diversas pruebas de coagulación, a pesar de que *in vivo* se relaciona con la presencia de fenómenos trombóticos. Algunos autores han propuesto la utilización del termino anticoagulante parecido al lupus (*lupus-like anticoagulant*) (194-95).

Por otra parte, la primera comunicación indirecta de los anticuerpos anticardiolipina (ACL) probablemente fue efectuada por Wasserman en 1906, al detectar en el suero de enfermos luéticos una "reagina" que reaccionaba con el extracto hepático salino de un feto con sífilis congénita. Asimismo, en las décadas siguientes se observó que diferentes tejidos eran una buena fuente de este material antigénico (211-12). Pangborn (180), en 1941, demostró que

el antígeno aislado de extractos alcohólicos de músculo cardíaco de buey era un fosfolípido que se denominó cardiolipina. El empleo de cardiolipina pura mezclada con cantidades equitativas y ajustadas de lecitina y colesterol como agentes sensibilizantes permitieron posteriormente la realización de las pruebas de fijación del complemento y floculación para detectar la *reagina*, la cual estaría constituida en parte por ACL (211).

Como resultado de amplios estudios realizados en personal militar y civil durante la Segunda Guerra Mundial, se pudo comprobar que un gran número de individuos presentaba positividad de alguna de estas pruebas, sin evidencia clínica de sífilis (215). El desarrollo de la prueba de inmovilización de treponemas por Nelson et al. (216), en 1949, permitió una mejor diferenciación entre los enfermos con pruebas positivas frente a la sífilis y aquéllos con SLFP.

Moore y Mohr (215) encontraron dos grupos reactivos falsamente positivos: aquéllos con una SLFP de forma transitoria (generalmente secundaria a una infección intercurrente) y un segundo grupo en el que estas pruebas permanecían positivas persistentemente. Este último grupo fue denominado *falso positivo biológico crónico*, el cual incluiría a todos aquellos individuos sin evidencia clínica o

epidemiológica de sífilis, que presentan de forma repetida serología luética reagínica positiva y a la vez determinaciones negativas de las pruebas treponémicas durante más de seis meses.

En 1955 Moor y Lutz (144), observaron que los enfermos con SLFP crónica presentaban una incidencia elevada de enfermedades autoinmunes. Varios estudios prospectivos realizados posteriormente, demostraron que la SLFP crónica podía incluso preceder en varios años a diversas enfermedades autoinmunes, sobre todo al LES (211,217-20). En la actualidad la lista de procesos en los que se han detectado ACL es prácticamente superponible a la del AL.

Durante mucho tiempo se consideró que la presencia de esta SLFP y, por tanto de los ACL, era solamente un marcador más del LES y otras enfermedades autoinmunes. En los últimos años, su estudio ha cobrado de nuevo un gran interés por la relación de los ACL con diversas manifestaciones clínicas, que al igual que en el caso del AL, incluyen la presencia de trombosis, abortos de repetición y trombocitopenia (9-14).



## 2.6.2 Propiedades físico-químicas e inmunológicas

### 2.6.2.1 Anticoagulante lúpico

Diversos estudios han demostrado que el AL es un anticuerpo. Destacan en este sentido los trabajos de Yin y Gaston (199), que en 1965 aislaron una fracción proteica IgG con actividad anticoagulante, así como los de Thiagarajan et al. (12) que en 1980 aislaron un anticuerpo monoclonal IgM con actividad AL en un enfermo afecto de una macroglobulinemia de Waldenström.

La acción de este anticuerpo se produce *in vitro* a nivel del complejo protrombinasa en la cascada de la coagulación, como se deduce de su efecto sobre las pruebas de coagulación rutinarias (199-201). En efecto, el AL se detecta clásicamente por una prolongación de los tiempos de cefalina (TTPA) y de protrombina (177,196-202) y la normalidad del tiempo de trombina, situación que no se corrige tras la adición de plasma normal, lo que descarta un déficit de un factor de la coagulación. Esta alteración sugiere que el AL no tiene efecto sobre la vía extrínseca ni intrínseca por encima de la activación del factor X, ni tampoco en las fases finales de la coagulación, al ser normal el tiempo de trombina. El complejo protrombinasa está compuesto por el factor X y el factor V activados, calcio

y un elemento fosfolipídico denominado factor plaquetario 3. Recientemente han sido identificados como integrantes de este elemento fosfolipídico el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina. Existen evidencias claras de que el AL actuaría a través de su unión con el componente fosfolipídico del complejo protrombinasa, la mayor parte del cual se encuentra situado sobre la membrana plaquetaria (178).

#### 2.6.2.2. Anticuerpos anticardioplipina

Por otra parte, actualmente se sabe que la *reagina* de la SLFP y los ACL son inmunoglobulinas de los isotipos IgG, IgM o IgA (221-23). Los ACL obtenidos de animales o enfermos luéticos reaccionan tanto con la cardioplipina como con otros fosfolípidos (reactividad cruzada) (221-30), motivo por el cual aún existen muchos interrogantes sobre la especificidad de estos anticuerpos. Los estudios iniciales, mediante técnicas de floculación y fijación del complemento, utilizaban cardioplipina y otros fosfolípidos mezclados con concentraciones variables de lecitina y colesterol. Por ello, los resultados obtenidos en estos primeros estudios deben ser interpretados con cierta precaución. Asimismo, los ACL detectados en enfermos luéticos pueden ser diferentes de aquéllos presentes en enfermos con SLFP (228). Dos grupos de investigadores

(181,229) han encontrado que los ACL obtenidos de animales o de enfermos sífilíticos reaccionan mejor con la molécula de cardiolipina intacta. También se ha demostrado que existe una disminución de la reactividad de los ACL después de sacar un ácido fosfatídico de la molécula de cardiolipina o el grupo hidroxil central, o bien alargando la distancia entre los grupos fosfodiéster. La cardiolipina pierde su carácter antigénico si los grupos glicérido de la molécula se sustituyen por grupos benzilo (181), o bien si se eliminan más de dos ácidos grasos de la molécula (229). Estos investigadores llegaron a la conclusión de que los anticuerpos se unían a uno o ambos grupos fosfodiéster de la molécula de cardiolipina, pero las porciones glicéridas de la molécula eran esenciales para su reactividad.

Más especulativos han sido los trabajos de diferentes autores (226) que han sugerido una reactividad cruzada entre los ACL y diferentes porciones de la molécula de ADN o ARN o con los anticuerpos anti-ADN en pacientes afectados de LES. En este sentido, los estudios de Harris et al. (182) no han encontrado ninguna correlación entre los niveles de ACL y los de Ac anti-ADN nativo.

Parece muy evidente que los anticuerpos responsables de la SLFP son distintos de los que se objetivan en enfermos lúeticos. Dicha hipótesis esta refrendada por el hecho de

que la SLFP acostumbra a ser positiva a títulos bajos, mientras que los enfermos luéticos no tratados presentan valores muy elevados (231). Por otra parte, algunos estudios preliminares utilizando el RIA en fase sólida para detectar ACL, muestran que el suero sifilítico da resultados positivos bajos o negativos, pero que los individuos con SLFP y otros con serología luética negativa presentan títulos elevados de ACL (183). En base a estos resultados, es probable que el epítotope de la molécula de cardiolipina, cuando esta se mezcla con lecitina y colesterol al hacer las pruebas clásicas de la sífilis, sea diferente del de la cardiolipina que se une a la superficie del plástico utilizado en el RIA o el ELISA en fase sólida.

#### 2.6.2.3 Anticuerpos dirigidos contra otros fosfolípidos

Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas de ELISA que detectan otros anticuerpos dirigidos contra otras estructuras fosfolipídicas de carga negativa distintas a la cardiolipina, tales como la fosfatidilserina (AFS), fosfatidilinositol (AFI) y ácido fosfatídico (AAF) (183-88,357,415), o bien de carga neutra como la fosfatidiletanolamina (409). Estos AAF, también se han asociado con las mismas manifestaciones que los ACL y el AL, aunque hay discordancia entre los autores sobre su importancia como pruebas de rutina para la detección de AAF.

### 2.6.3 Métodos de detección

#### 2.6.3.1 Pruebas coagulométricas dependientes de fosfolípidos

Debido a que el AL inhibe *in vitro* la activación de la protrombina por su acción sobre el componente fosfolipídico del complejo protrombinasa, para su detección se emplean aquellas pruebas en las que intervienen fosfolípidos en su realización. La presencia del AL prolongará los tiempos de coagulación. En su detección se utilizan además de las pruebas de coagulación rutinarias como son el *tiempo de protrombina* y el *tiempo de tromboplastina parcial o tiempo de cefalina*; otras técnicas más sensibles entre las que destacan el *tiempo de tromboplastina parcial activado o tiempo de cefalina-caolín*, el *tiempo de inhibición de la tromboplastina tisular diluida*, el *tiempo del veneno de víbora de Russell diluido* y los *tiempos de caolín* y de *caolín modificado de Exner* (19-22,140,192,205-10).

Como hemos comentado anteriormente, la detección de un alargamiento en el tiempo de coagulación por alguna de las pruebas citadas, nos induce a pensar en la presencia de un AL. No obstante, siempre debe descartarse la existencia de un déficit factorial y/o de un anticoagulante antifactorial. Para ello, se incubaba el plasma patológico con plasma normal y en el caso de que el plasma del enfermo

contenga un AL, la prueba coagulométrica persistirá alterada, situación inversa a la de un déficit factorial, ya que el plasma normal aporta los factores deficitarios y se corrigen las pruebas (176-77).

Otra técnica de comprobación de un AL es la *prueba de neutralización con plaquetas*, que consiste en añadir plaquetas lavadas a un plasma en el cual se ha detectado un alargamiento de las pruebas de coagulación. Si la causa de este alargamiento es un AL, al añadir las plaquetas se normalizará el tiempo de coagulación, ya que éstas aportan los fosfolípidos necesarios (20).

Es necesario remarcar que en un paciente con AL, no necesariamente todas las pruebas comentadas anteriormente van a estar alteradas. Por ello, es necesario efectuar además de las pruebas rutinarias de coagulación (tiempo de cefalina y tiempo de protrombina), alguna de las técnicas coagulométricas más sensibles ya referidas (20-21, 207, 362).

#### 2.6.3.2 Pruebas reagínicas de serología luética

Las más utilizadas son las de floculación (VDRL, *Venereal Disease Research Laboratory*), de aglutinación (RPR, *Rapid Plasma Reagin*) y de fijación del complemento (reacción de Wasserman). Todas ellas utilizan cardiolipina mezclada con

lecitina y colesterol como agentes sensibilizantes. La positividad de estas pruebas, junto con la negatividad de las treponémicos (técnica de inmovilización de los treponemas de Nelson y de inmunofluorescencia indirecta o *FTA-absortion*) se denomina SLFP y constituye una forma indirecta de detectar a los ACL (233).

#### 2.6.3.3 Técnicas inmunológicas

Fundamentalmente son el *radioinmunoensayo (RIA)* y el *enzimoinmunoensayo (ELISA)*. Ambas técnicas consisten en fijar el fosfolípido (cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, etc) en el fondo de un pozuelo, al que se le añade posteriormente el suero del paciente y después antiinmunoglobulinas marcadas, bien radiactivamente en el caso del RIA (182), o con una enzima (habitualmente fosfatasa alcalina) en el ELISA (23-24,350-52). En el primer caso, la cantidad de radiactividad detectada será proporcional a la cantidad de AAF y en el segundo, al añadir un substrato a la muestra éste se hidrolizará por acción de la fosfatasa alcalina y dará lugar a una sustancia coloreada, siendo la intensidad del color detectada proporcional a la cantidad de AAF presentes en el suero problema.

Actualmente, el ELISA es la prueba más aceptada y que se efectúa de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios ya que ofrece ventajas claras: a) medición directa de la cantidad de anticuerpo capaz de reaccionar con un antígeno específico sin posibilidad de sufrir interferencias por otras sustancias; b) cuantificación de forma estandarizada de sus niveles; c) posibilidad de detectar los diferentes isotipos (IgG, IgM e IgA); d) sensibilidad parecida al RIA, con la ventaja de no utilizar material radiactivo; e) menor coste económico; f) mayor rapidez de realización con la ventaja adicional de analizar un gran número de casos simultáneamente y g) utilización de suero por lo que facilita la posibilidad de estudiar enfermos anticoagulados (10,20-21).

#### **2.6.4 Manifestaciones clínicas**

Los fenómenos trombóticos, venosos y arteriales, los abortos y muertes fetales así como la trombocitopenia son las manifestaciones clínicas más frecuentemente asociadas a los AAF y donde las posibles relaciones etiopatogénicas han sido más estudiadas. No obstante, diversos autores han relacionado también los AAF con otros procesos, como anemia hemolítica autoinmune o afección del sistema nervioso central, al mismo tiempo que han propuesto sus probables relaciones etiopatogénicas.

#### 2.6.4.1 Trombosis

Los primeros estudios sobre el AL hacían énfasis en su asociación con hemorragias (141,196,197,202), aunque pronto se comprobó que esto solo acontecía cuando se asociaba a trombocitopenia intensa (169,176,192,243) o a otros déficits de factores de la coagulación (176,201,203,210). Incluso la tendencia a la hemorragia era mínima en aquellos pacientes sometidos a cirugía (198,243).

Paradójicamente, el AL, que se asocia *in vitro* a la prolongación del tiempo de coagulación, se relaciona *in vivo* con la presencia de trombosis. Esta asociación ha sido comprobada de forma fehaciente por numerosos investigadores (150,169,175,191,232,243-47).

También se ha descrito la asociación entre SLFP, presencia de AL y existencia de trombosis. Johansson y Lauss (232) estudiaron 96 pacientes con SLFP y encontraron que 36 de ellos presentaban AL y 8 tenían trombosis de repetición. Estos mismos autores, en un trabajo posterior (248), describieron 8 pacientes con SLFP y AL, que presentaban trombosis venosas recurrentes en las extremidades inferiores y púrpura necrotizante ulcerada cuya biopsia cutánea demostró una proliferación de capilares dérmicos sin signos inflamatorios.

Harris et al. (182), mediante una técnica de RIA en fase sólida, estudiaron una serie de 65 enfermos con LES y otras enfermedades autoinmunes y encontraron un aumento de los ACL en 15 de 18 enfermos con historia de trombosis venosas o arteriales. Asimismo, también pudieron observar una correlación significativa entre los niveles de los ACL y las trombosis. En 16 de los 18 pacientes con trombosis tenían también AL. En un estudio prospectivo (249) de 15 casos con enfermedades autoinmunes e infartos cerebrales, 13 presentaban un aumento de los ACL del isotipo IgG. En los últimos años, otros muchos autores han descrito en sus trabajos la asociación entre la presencia de AAF y la existencia de fenómenos trombóticos, tanto a nivel arterial como venoso, afectando diversos territorios. Así, se han descrito trombosis venosas en las extremidades, a veces complicadas con tromboembolismos pulmonares e hipertensión pulmonar (250-56), en las venas renales (257), cavas, hepáticas, suprahepáticas (enfermedad venooclusiva, síndrome de Budd-Chiari) (234,258-59), retinianas (260), etc. Por lo que respecta a las trombosis arteriales, se han descrito en las coronarias (angor, infarto agudo de miocardio) (234,257,261), cerebrales (accidentes isquémicos transitorios, accidentes vasculares cerebrales, demencia multiinfártica) (262), axilares (263), arterias de las extremidades (úlceras, púrpura necrotizante, gangrena) (264), mesentéricas (infarto intestinal) (265), retinianas

(260), renales (nefropatía, hipertensión) (11), etc.

#### 2.6.4.2 Abortos y muertes fetales de repetición

Los AAF aparecen también relacionados con las muertes fetales intrauterinas de repetición. Hughes et al. (9,266) estudiaron 21 pacientes con abortos y encontraron que 16 de ellas presentaban AL o niveles elevados de ACL. Diversos estudios (267-68,271) han confirmado estos hallazgos y han observado que las muertes intrauterinas se producen en cualquier período del embarazo, aunque con más frecuencia en el segundo y tercer trimestre. Muchas de estas pacientes no tienen ninguna enfermedad autoinmune de base establecida y a menudo se presentan solamente con abortos o muertes fetales intrauterinas y escasos síntomas o signos de afección inmunológica que no llegan a definir ninguna enfermedad concreta (268,270-73).

Carreras et al. (153,246) han descrito que el AL inhibe la producción de prostaciclina por parte del miometrio humano gestante. Estos autores postulan que la prostaciclina podría jugar un papel importante en la regulación de la circulación fetal, y de hecho, un déficit en su producción por parte de los vasos placentarios podría ocasionar una disminución del flujo sanguíneo, formación de infartos placentarios y, en consecuencia, sufrimiento fetal.

Los hallazgos de Hughes et al. (9) de infartos placentarios múltiples en los estudios anatomopatológicos de placentas procedentes de fetos abortados en enfermas con LES y AAF, apoyan esta hipótesis.

#### 2.6.4.3 Trombocitopenia

Al igual que en las situaciones clínicas ya comentadas, también se ha demostrado una asociación entre trombocitopenia y la presencia de AAF. En un estudio (274) sobre 116 enfermos con LES y otras enfermedades inmunológicas, se encontraron unos niveles elevados de ACL del isotipo IgG en 30 de 43 enfermos con trombocitopenia. Existía también una fuerte correlación entre los niveles elevados de ACL-IgG y el grado de trombocitopenia ( $p < 0.001$ ). Así, de los 20 pacientes con los niveles más elevados de ACL-IgG, el 80% tenían trombocitopenia. En otro estudio, de 96 pacientes con PTI, se detectaron niveles elevados de ACL de los serotipos IgG y/o IgM en 30 casos (275).

#### 2.6.4.4 Afección del sistema nervioso central (SNC)

Además de la afección del SNC producida por la alteración vascular secundaria a las trombosis (accidentes isquémicos transitorios, accidentes vasculares cerebrales, demencia multiinfártica) (262), resulta también posible que

los AAF se puedan unir directamente al tejido cerebral y estar implicados en la patogenia de algunas de las manifestaciones neurológicas del LES y de las restantes enfermedades inmunológicas. En un trabajo prospectivo de enfermos con SLFP, Catterall et al. (211) encontraron seis mujeres que habían desarrollado una mielopatía transversa similar a la esclerosis múltiple. Debido a que estas enfermas presentaban algunos rasgos de LES, Catterall denominó a este síndrome *esclerosis lupoides*. Trabajos posteriores (276) sugirieron que la esclerosis lupoides podría ser una variante del LES caracterizada por la presencia de síntomas neurológicos crónicos y signos sugestivos de esclerosis múltiple y con alteraciones biológicas que incluyen una velocidad de sedimentación globular elevada, anticuerpos antinucleares positivos, presencia de células LE y SLFP. Este síndrome es parecido en algunos aspectos a otro proceso descrito en varias islas del mar Caribe, denominado neuropatía jamaicana. Las características de esta entidad son la presencia de mielopatía transversa con afección de los cordones posteriores, atrofia óptica y alteraciones del VIII par (277). Hughes et al. (9) describieron recientemente un paciente con este proceso que tenía SLFP, anticuerpos antinucleares positivos y ACL del isotipo IgM elevados.

Otras manifestaciones neurológicas presentes en el LES en donde se ha descrito su asociación con la presencia de AAF son migraña, epilepsia, corea y síndrome de Guillain-Barré (278,318-19,323). Es probable que en la patogenia de estos procesos participen fenómenos trombóticos (microinfartos) favorecidos por los AAF (280-84).

Aunque podría ser sugerente la hipótesis de que los AAF tuvieran un papel patogenético en la esclerosis múltiple, Catterall (211) no encontró ninguno con SLFP en un estudio efectuado con 69 pacientes afectados de este proceso. Por otra parte, Harris et al. (324) no han encontrado una incidencia estadísticamente significativa en los niveles de ACL en los sueros de 94 enfermos con esclerosis múltiple.

#### 2.6.4.5 Otras manifestaciones clínicas

En algunas series de enfermos ha sido descrita la asociación de AAF con lúvido reticularis y accidente vascular cerebral (síndrome de Sneddon) (9,11) lesiones valvulares cardíacas (endocarditis de Libman-Sacks, insuficiencia mitral) (285,410), anemia hemolítica autoinmune, síndrome de Evans (266,415), neutropenia (415), hipertensión arterial (266,286), toxemia gravídica (266) y un síndrome postparto caracterizado por la asociación de

fiebre, neumonitis, pleuritis, infartos pulmonares y miocarditis (287).

#### 2.6.5 Síndrome antifosfolípido primario

Otro aspecto que ha llamado la atención de muchos investigadores es la observación de pacientes que presentan el *síndrome de los AAF* pero que no reúnen criterios diagnósticos suficientes de ninguna enfermedad conocida. Este es el caso, por ejemplo, de pacientes jóvenes con trombosis venosas de repetición, infartos de miocardio o accidentes vasculares cerebrales, sin factores de riesgo vascular y de mujeres con abortos y/o muertes fetales de repetición de etiología no aclarada, en los cuales se objetiva la presencia de AAF como única alteración autoinmune destacable (243,288,295-298,375). Este hecho, comentado por primera vez por Soulier y Boffa (269) en 1980, ha motivado la definición por diversos autores (395-403) del denominado *síndrome antifosfolípido primario*, con la finalidad de incluir en él a aquellos pacientes que presentan dichas manifestaciones clínicas asociadas a la existencia de AAF y sin criterios de ninguna otra entidad.

En base a nuestra experiencia (402), este síndrome constituye probablemente una entidad con unas características clínicas y biológicas propias. No obstante,

ante la presencia de este cuadro se debe descartar con seguridad la existencia de otra enfermedad autoinmune subyacente, como el LES, que utilice como forma de presentación esta sintomatología. Creemos que este concepto, en un futuro próximo, obligará al médico a modificar el enfoque diagnóstico frente a los pacientes con trombosis y abortos de repetición hasta ahora considerados como idiopáticos. Sin embargo, se precisa un mayor número de estudios y un seguimiento más prolongado de estos enfermos para determinar la incidencia real de este síndrome y profundizar en su etiopatogenia y evolución.

#### 2.6.6 Diagnóstico del síndrome de los AAF

En base a estas manifestaciones descritas asociadas a los AAF, se han propuesto diversos criterios para el diagnóstico del *síndrome de los AAF*. Así, Harris (377) agrupa una serie de manifestaciones clínicas que con mayor frecuencia se asocian a la presencia de AAF (trombosis arterial y/o venosa, abortos de repetición y trombocitopenia) junto a parámetros de laboratorio (AL y ACL). Para el diagnóstico de este síndrome se requeriría como mínimo un criterio clínico y otro analítico, con la condición de que los AAF sean positivos en más de una ocasión, separados por un intervalo superior a 8 semanas.

Recientemente, Alarcón-Segovia (404) ha sugerido otros criterios, divididos en mayores (pérdida fetal recurrente, anemia hemolítica, trombocitopenia, *livedo reticularis* y trombosis venosas y/o arteriales) y menores (migraña y corea). Para el diagnóstico del *síndrome de los AAF* sería preciso cumplir dos criterios mayores, o bien uno mayor y dos menores, tener un título positivo de ACL y presentar un año o más de evolución.

Ambas propuestas constituyen un notable esfuerzo para unificar los diagnósticos del *síndrome de los AAF*. No obstante, deben clarificarse mejor cuales son las manifestaciones clínicas que realmente se asocian a la presencia de AAF y cuales son las técnicas más adecuadas para determinar estos anticuerpos.

#### **2.6.7 Mecanismos de acción**

A pesar de que la asociación entre los AAF y diversas complicaciones clínicas está ampliamente establecida, el mecanismo patogénico íntimo mediante el cual estos anticuerpos producen trombosis sigue siendo desconocido, aunque probablemente intervengan diversos factores (figura 2).

Dado que los fosfolípidos son constituyentes esenciales de la membrana celular y participan activamente en el sistema hemostático, es razonable que la mayoría de las teorías patogenéticas propuestas se hayan basado principalmente en el estudio de la acción de dichos anticuerpos sobre la plaqueta y la célula endotelial.

A continuación revisaremos algunos de los mecanismos patogénicos descritos hasta la actualidad:

1. Alteración de la síntesis y secreción de prostaciclina por el endotelio vascular

La prostaciclina es un potente vasodilatador y antiagregante plaquetario. Carreras et al. (152,246) en 1981 describieron una mujer de 31 años con AL, antecedentes de trombosis arterial recurrente y dos abortos. La fracción IgG de esta paciente disminuía la liberación de prostaciclina

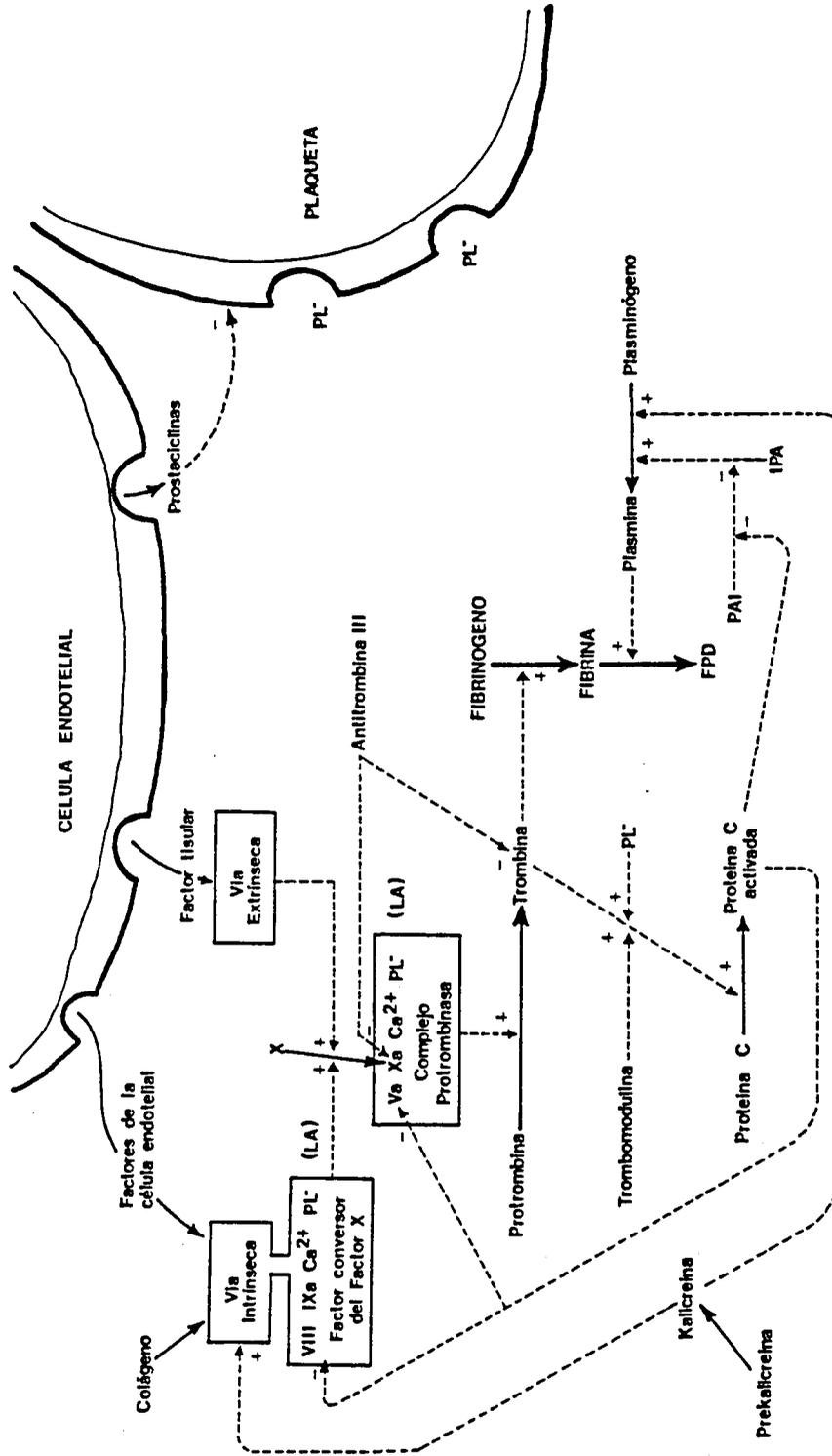


Figura 2. Esquema de la coagulación sanguínea y de los probables mecanismos de acción de los AAF

del endotelio de la aorta de rata, mientras que la presencia de ácido araquidónico suprimía tal efecto. La producción de 6,ceto-prostaglandina F-1 $\alpha$  en el cultivo de células endometriales bovinas estaba asimismo disminuida. Estos hallazgos sugirieron que los AAF interferían la síntesis y/o secreción de prostaciclina de la pared vascular, probablemente por inhibición de la síntesis de ácido araquidónico proveniente de la célula endotelial. Posteriormente, estos mismos autores demostraron un efecto similar en 8 de 14 pacientes con AL, 6 de los cuales habían presentado fenómenos trombóticos. Otros autores en trabajos posteriores describieron resultados similares. Sin embargo, es improbable que la alteración de la síntesis de prostaciclina sea el único mecanismo implicado en la génesis de la trombosis en los pacientes con AAF, dado que tal anomalía no se comprueba en todos los casos e incluso algunos autores afirman que la presencia de dichos anticuerpos no sólo no inhibe sino que estimula la síntesis de prostaciclina en los cultivos de células endoteliales (370).

Por otro lado, no se ha demostrado que los AAF tengan afinidad en condiciones basales por las células endoteliales obtenidas mediante cultivo de vena umbilical humana.

## 2. Disminución de la fibrinólisis

El endotelio vascular contribuye a la prevención de la trombosis a través de la secreción del activador del plasminógeno y de su inhibidor específico. En el LES se ha demostrado una disminución de la fibrinólisis. Angeles-Cano et al. (150) en 1979 observaron una disminución de la capacidad fibrinolítica en 24 de 28 pacientes con LES, 12 de los cuales tenían AL y 5 de ellos habían presentado episodios trombóticos. Estos hallazgos fueron corroborados en trabajos posteriores. Sin embargo, recientemente, dos elegantes trabajos de Bayron et al. han mostrado resultados totalmente opuestos (153-54).

## 3. Alteración de los inhibidores de la coagulación: proteína C, proteína S, trombomodulina y antitrombina III

Comp et al. (236) demostraron que la fracción IgG de 2 pacientes con AL inhibía la función de la trombomodulina, cofactor endotelial necesario para la activación de la proteína C por la trombina. Esta inhibición ha sido también demostrada mediante cultivo de células endoteliales (238-40,242).

Cariou et al. (237) describieron una alteración cualitativa de la proteína C con niveles antigénicos normales en pacientes con AL. Asimismo, Ruiz-Argüelles et al. (403) observaron una disfunción de la proteína C en 8 de 62 pacientes con LES, 4 de los cuales habían presentado fenómenos trombóticos. Asimismo, Friedman et al. detectaron un déficit de proteína S en pacientes con AL (241).

Aunque la mayoría de los trabajos han encontrado niveles normales de antitrombina III en pacientes con AL, Jarrett et al. (372) observaron la deficiencia adquirida de antitrombina III en algunos pacientes con LES. Cosgriff et al. demostraron alteraciones cualitativas de la antitrombina III en pacientes con AL y trombosis recurrentes. Sin embargo, la deficiencia primaria de los inhibidores de la coagulación cursa con trombosis exclusivamente venosas, siendo extraordinariamente excepcional la presencia de trombosis arterial. Por lo tanto, es improbable que una deficiencia aislada de estos factores pueda explicar los diversos fenómenos trombóticos, tanto arteriales como venosos, de los pacientes con AAF.

#### 4. Acción de los AAF sobre las plaquetas

Dado que los fosfolípidos de la membrana plaquetaria intervienen en el proceso trombótico y que la trombocitopenia es un hallazgo frecuente en los pacientes con AAF, algunos investigadores han propuesto que los AAF reaccionarían con la plaqueta produciendo la activación de la misma e iniciando el proceso trombótico (234,411).

Rauch et al. (367-69) encontraron que algunos hibridomas monoclonales con actividad anticoagulante se unían a las plaquetas. Frampton y Cameron observaron que los AAF purificados por afinidad inhibían la producción de tromboxano de plaquetas activadas y no de plaquetas intactas.

A pesar de que ninguna de estas observaciones demuestra con absoluta seguridad la participación plaquetaria en la patogenia de la trombosis de los pacientes con AAF, la demostración de la afinidad de dichos anticuerpos por las plaquetas abre un apasionante capítulo de investigación.

Si los anticuerpos dirigidos contra los fosfolípidos pueden tener algún papel en la patogenia del fenómeno trombótico, probablemente sea a través de varios mecanismos

de acción, dada la amplia ubicuidad de tales antígenos y quizás es necesaria la presencia de factores precipitantes, todavía desconocidos, como ocurre en otros estados de hipercoagulabilidad.

Resulta de especial interés el hallazgo por Escolar et al. (404), de que el plasma de pacientes afectos de LES y con AAF, provoca un aumento significativo de la agregabilidad plaquetaria sobre un modelo experimental de perfusión, a diferencia del plasma de sujetos normales o de aquellos con LES sin AAF. Este estudio constituye la primera demostración sobre un modelo experimental de que los AAF están realmente implicados en la producción de trombosis.

La aparición de trombocitopenia y anemia hemolítica se atribuye a la destrucción de plaquetas y hematíes como consecuencia de la unión de los AAF con fosfolípidos de carga negativa de las membranas de estos elementos sanguíneos. La destrucción se produciría por la acción lítica del complemento en los vasos sanguíneos o tras su captación por el sistema mononuclear fagocítico (114). Es de destacar que los fosfolípidos de carga negativa se encuentran en la parte interna de las membranas de plaquetas y hematíes, por lo que no se encuentran estimulados de forma constante por los AAF. En cambio, la lesión de estas células, o la simple activación y/o agregación plaquetaria,

provoca la exteriorización de estos fosfolípidos y su exposición a la acción de los AAF. Por otra parte, la presencia de alteraciones neurológicas podría deberse, como ya se ha comentado anteriormente, tanto a la existencia de fenómenos trombóticos (accidentes vasculares cerebrales, corea) como a la acción directa sobre las células nerviosas (mielopatía transversa). A este respecto, son interesantes los estudios de Hirano et al. (283) que detectan anticuerpos linfocitotóxicos que presentan reactividad cruzada con el tejido cerebral y los glicolípidos de la membrana de los linfocitos, por lo que es posible que una subpoblación de anticuerpos linfocitotóxicos esté constituida por AAF.

En conclusión, los AAF parecen jugar un papel importante en el desarrollo de fenómenos trombóticos y diversas alteraciones hematológicas y neurológicas. Este papel se desprende, en primer lugar, del hallazgo de una correlación significativa entre su presencia y la existencia de estas manifestaciones clínicas y, en segundo lugar, de los resultados de diversos estudios experimentales *in vitro* que son compatibles con una participación de los AAF en la producción de estas alteraciones. No obstante, su potencial etiopatogénico *in vivo* no está suficientemente determinado y es preciso delimitar su ubicación dentro de los mecanismos patogénicos presentes en las enfermedades autoinmunes.

### 2.6.8 Perspectivas terapéuticas

Varios investigadores (176,192,198,243,288-89) han observado una disminución en la actividad del AL tras tratamiento con corticosteroides o inmunosupresores. Asimismo, algunos estudios preliminares (9) han sugerido que la plasmaféresis más prednisona y otras drogas inmunosupresoras pueden disminuir tanto la actividad del AL como de los ACL. Cabe destacar el estudio de Lubbe et al. (271), en el que describen 6 mujeres con LES y abortos de repetición, todas ellas con AL. El tratamiento de las mismas con prednisona y aspirina conllevó a una desaparición del AL y permitió que los embarazos llegaran a término de un modo satisfactorio. Estos hallazgos han sido posteriormente comprobados por otros autores en series más amplias de pacientes (247,286,290).

El tratamiento de los enfermos con AAF se basa en la premisa de que éstos desarrollan un papel etiopatogénico en la trombosis, trombocitopenia y abortos de repetición. No obstante, debemos tener en cuenta que no todos los enfermos con AAF presentan estas complicaciones. Actualmente, se considera que probablemente no está justificado el tratamiento de los enfermos con AAF sin manifestaciones clínicas activas, excepto en el caso de las mujeres embarazadas con AAF y antecedentes de abortos.

Asimismo, dada la morbilidad y mortalidad potencial en la recurrencia de accidentes vasculares cerebrales o trombosis venosas con tromboembolismos pulmonares, parece estar indicado un esfuerzo para eliminar los AAF en los enfermos que han presentado previamente alguno de estos episodios. El problema radica en el hecho de determinar qué tratamiento es el más idóneo en estos casos (9). El papel de los antiagregantes plaquetarios y de los anticoagulantes orales en la prevención de las trombosis recurrentes en enfermos con AAF es incierto (191-92,245,291-330). La experiencia de diversos grupos de investigación parece demostrar que algunos enfermos continúan presentando trombosis a pesar de una adecuada terapia anticoagulante. Actualmente se encuentra en curso un estudio prospectivo multicéntrico internacional destinado a evaluar las diversas pautas terapéuticas (*Kingston Antiphospholipid Study, KAPS*) (331). No obstante, hoy en día se aconseja la utilización conjunta de anticoagulantes orales durante períodos prolongados de tiempo, asociados ocasionalmente a drogas inmunosupresoras, como los corticoides, en todos aquellos enfermos con historia de trombosis y con AAF (9,331).

### III. OBJETIVOS

Entre los diversos autoanticuerpos descritos en el LES, los anticuerpos antifosfolípido (AAF) destacan por el gran interés que su estudio ha despertado en los últimos años. La detección de los AAF se ha realizado en las últimas dos décadas de forma indirecta mediante diversas técnicas. Las más clásicas son las pruebas coagulométricas, que detectan anticuerpos contra la fracción fosfolipídica del complejo de la protrombinasa y que reciben el nombre genérico de anticoagulante lúpico (AL). Otro método clásico, pero también indirecto, consiste en la detección de una serología luética falsamente positiva empleando técnicas reagínicas (VDRL, RPR).

Más recientemente, se han descrito diversas técnicas para la detección directa de los AAF, como el radioinmunoensayo (RIA) y el enzimoimmunoensayo (ELISA), que han permitido reconocer otros anticuerpos contra fosfolípidos de carga negativa fundamentalmente los anticuerpos anti-cardiolipina (ACL).

La mayoría de los estudios para valorar la incidencia de los AAF en pacientes con LES, determinan el AL o los ACL, y raramente ambos a la vez, por lo que disponemos de pocos datos sobre cual es el más eficaz. Además, recientemente se ha observado que no todos los pacientes con AL tienen ACL y viceversa.

La incidencia del AL en los pacientes con LES oscila ampliamente según las series publicadas. La variabilidad puede deberse a diversos factores, aunque lo más probable es que sea consecuencia de diferencias en la sensibilidad de las diversas pruebas de coagulación utilizadas para su detección. Además, hoy en día, no existe un acuerdo unánime sobre cual de estas pruebas es la más adecuada para la detección del AL. Otros inconvenientes añadidos en la detección del AL, son que las pruebas coagulométricas, a diferencia del ELISA, no permiten el estudio rutinario de series amplias de pacientes debido a su laboriosidad, y tampoco la cuantificación de los niveles de anticuerpos. Por último, dificultan la detección del AL en sujetos bajo tratamiento anticoagulante ya que emplean plasma y no suero.

Aunque los ACL en el LES, han sido los AAF mejor estudiados, no obstante, todavía existe controversia sobre su relación con algunas manifestaciones clínico-biológicas del LES, así como su posible utilidad como marcadores de actividad clínica de la enfermedad.

Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas de ELISA que detectan otros AAF dirigidos contra otras estructuras fosfolipídicas distintas a la cardiolipina, tales como la fosfatidilserina (AFS), fosfatidilinositol (AFI) y ácido fosfatídico (AFA). Hasta el momento actual

disponemos de pocos estudios prospectivos sobre poblaciones amplias de pacientes con LES, en los que se hayan estudiado estos AAF, por lo que existen numerosas incógnitas en cuanto a su correlación con las distintas manifestaciones clínicas y biológicas y, por lo tanto, sobre su posible utilidad práctica.

En base a las consideraciones anteriores, los objetivos de la presente Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Determinar la incidencia del anticoagulante lúpico en el LES, en base al empleo de una amplia batería de pruebas coagulométricas, a fin de valorar la utilidad de cada una de ellas.
2. Desarrollar una técnica de ELISA para determinar el anticoagulante lúpico, que fuera sencilla, reproducible y que permitiera sustituir a las pruebas coagulométricas.
3. Determinar la incidencia de los anticuerpos anti-cardiolipina por ELISA, junto con otros AAF, como los anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidilinositol y los anti-ácido fosfatídico.

4. Evaluar la relación de los distintos AAF entre sí.
  
5. Correlacionar los diferentes AAF determinados en este estudio con la presencia de diversas manifestaciones clínicas y/o analíticas, a fin de comprobar si definen algún subgrupo específico.

#### IV. MATERIAL Y METODO

#### 4.1 SELECCION DE ENFERMOS

##### 4.1.1 Grupo de enfermos con LES

##### 4.1.1.1 Características generales

Se han estudiado de forma prospectiva durante 2 años (1988-89) 92 pacientes diagnosticados de LES en base a los criterios de la *American Rheumatology Association* (123) (tabla 3).

La obtención de datos para el estudio se efectuó aplicando un protocolo clínico-biológico, realizado por la misma persona que incluía:

##### 1. *Anamnesis:*

Antecedentes familiares. Con referencia especial a la existencia de miembros afectos de enfermedades autoinmunes u otras colagenosis.

Antecedentes personales. Hábitos tóxicos, embarazos, abortos, anticonceptivos orales, inmunizaciones pasivas previas o transfusiones sanguíneas.

Antecedentes patológicos. Enfermedades anteriores, sintomatología inicial de la enfermedad y en el momento del diagnóstico, evolución clínica y terapéutica del LES.

Enfermedad actual. Sintomatología clínica actual a distintos niveles:

GENERALES: fiebre, astenia, anorexia, pérdida de peso.

APARATO LOCOMOTOR: artralgias, artritis, nódulos subcutáneos, mialgias.

TABLA 3. Criterios diagnósticos del LES (ARA, 1982)

1. Eritema facial
2. Lupus discoide
3. Fotosensibilidad
4. Ulceras orales
5. Artritis no erosiva
6. Proteinuria superior a 0.5 gr/día o presencia de cilindros celulares o hemáticos
7. Convulsiones o psicosis
8. Pleuritis o pericarditis
9. Anemia hemolítica o trombocitopenia ( $<100.000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$ ) o leucopenia ( $<4.000$  leucocitos / $\text{mm}^3$ ) o linfopenia ( $<1.500$  linfocitos/ $\text{mm}^3$ ) en dos o más determinaciones
10. Anticuerpos anti-ADN nativo o anti-Sm o células LE o SLFP
11. AAN positivos

CUTANEOS: eritema en vespertilio, hiperpigmentación, lesiones mucosas, púrpura, urticaria, erupción cutánea inespecífica, alopecia, gangrena de las zonas distales, lesiones discoideas.

RENAL: hipertensión arterial, edemas, hematuria.

CARDIO-VASCULAR: dolor torácico, insuficiencia cardíaca, palpitaciones, fenómeno de Raynaud.

RESPIRATORIO: dolor pleural, disnea, expectoración, tos.

HEMATOLOGICO: síndrome anémico, coluria, dolor lumbar, púrpura, adenopatías.

NEUROLOGICO: trastornos de la conducta o de la marcha, epilepsia, neuralgias, cefalea, diplopía.

GASTROINTESTINAL: disfagia, dolor abdominal, ictericia, ascitis.

## 2. *Exploración física:*

Inspección general, constantes vitales y examen sistemático por aparatos, en busca de alteraciones propias del LES.

## 3. *Exploraciones complementarias:*

RADIOGRAFIA DE TORAX en proyección postero-anterior y lateral.

ELECTROCARDIOGRAMA

BIOLOGIA GENERAL: VSG, hemograma, glucemia, ionograma, BUN y creatinina en plasma y orina; proteínas totales y proteinograma; GOT, GPT, gamma GT, LDH, FA; sedimento urinario y proteinuria.

ESTUDIO INMUNOLOGICO BASICO: ANA, Ac anti-ADNn, factores del complemento ( $C_3$ ,  $C_4$  y  $CH_{50}$ ), inmunolectroforesis de las proteínas del suero.

DETERMINACION DE AAF: A todos los pacientes se les han efectuado la determinación del AL por técnicas coagulométricas (TTPA, TC, TITD y TVVRD), así como la cuantificación por ELISA de los AAF enfrente varios fosfolípidos (cardiolipina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol). Además, se han determinado los AAF empleando una nueva técnica de ELISA, desarrollada por nosotros, que utiliza tromboplastina parcial como antígeno y, que constituye uno de los objetivos principales de esta tesis.

La biología general se determinó el mismo día de la extracción de sangre. Para la práctica de las pruebas coagulométricas, la sangre fue introducida en tubos de plástico con citrato trisódico al 3,8% como anticoagulante (relación volumen 9/1) y posteriormente centrifugada a 1000 g durante 30 minutos a 40°C, el sobrenadante fue conservado en tubos de plástico de congelación a -70°C hasta su empleo. Para el estudio inmunológico básico y la detección de los AAF por ELISA, se ha empleado suero, obtenido tras la centrifugación en iguales características que antes de sangre coagulada, que tras ser alicuotado se almacenó en una seroteca a -70°C.

Todos los datos clínicos y biológicos fueron informatizados y almacenados en un ordenador IBM 3083.

#### 4.1.1.2 Subgrupos clínicos

Con la finalidad de analizar el comportamiento de los AAF en cada uno de ellos, los 92 pacientes se distribuyeron en diversos subgrupos clínicos: enfermos con trombosis, abortos, trombocitopenia, afección del sistema nervioso central, etc. No habían diferencias significativas respecto a la edad, sexo y el tiempo de evolución de la enfermedad entre estos diversos subgrupos.

##### 4.1.1.2.1 *Pacientes con trombosis*

Los enfermos se han distribuido en dos grupos en función de la presencia o ausencia de fenómenos tromboticos activos arteriales y/o venosos localizados en cualquier territorio vascular. Durante el periodo del estudio, en 7 pacientes se observaron un total de 11 episodios tromboticos. Los territorios afectados fueron los siguientes:

TROMBOSIS VENOSAS:	Vena subclavia derecha (1)
	Vena humeral derecha (2)
	Vena femoral derecha (1)
	Vena femoral izquierda (2)

El diagnóstico de las trombosis de los vasos de las extremidades fue hecho en base a los signos clínicos (presencia de signos inflamatorios con edema a nivel local), presencia de circulación colateral manifiesta y confirmación con estudio ultrasónico con sistema *doppler* y/o flebografía.

TROMBOSIS ARTERIALES:      Arterias cerebrales (accidentes  
vasculares cerebrales) (3)  
Tromboembolismo pulmonar (2)

El diagnóstico de los accidentes vasculares cerebrales se efectuó en base a los datos clínicos y la confirmación con la tomografía axial computadorizada. En el caso de los tromboembolismos pulmonares se realizó en función de los datos clínicos, gasométricos, radiológicos y confirmación con gammagrafía de ventilación-perfusión.

#### 4.1.1.2.2      *Pacientes con antecedentes de abortos*

Como ninguna paciente tuvo un aborto espontáneo durante el periodo de seguimiento del estudio, dividimos a las enfermas en dos grupos en función de la presencia o ausencia de antecedentes previos de abortos. De las 84 pacientes estudiadas, 17 habían presentado uno o más abortos espontáneos.

#### 4.1.1.2.3 *Pacientes con trombocitopenia*

Durante los dos años del estudio, 18 pacientes presentaron trombocitopenia ( $<100.000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$ ), por lo que asimismo dividimos a los pacientes en dos grupos en función de la presencia o no de plaquetopenia.

#### 4.1.1.2.4 *Afección del sistema nervioso central*

En 15 pacientes se detectaron manifestaciones clínicas de afección del sistema nervioso central, divididas de la siguiente forma:

- cefalea de tipo migrañosa: 12
- epilepsia: 3

En base a la presencia o ausencia de estas alteraciones dividimos a los enfermos en dos grupos. No incluimos en el primer grupo los 3 pacientes que presentaron un accidente vascular cerebral, así como a aquellos con síntomas depresivos, dado que en todos los casos estudiados estos síntomas eran leves.

#### 4.1.1.2.5 *Pacientes con otras manifestaciones clínicas*

También distribuimos a los pacientes en función de la presencia o no de afección articular, cutánea, pleuro-pericardica, renal, vasculítica, síndrome de Sjögren y hematológica distinta a la trombocitopenia (anemia hemolítica, neutropenia y linfopenia).



#### 4.1.1.2.6 *Pacientes con actividad clínica*

Los enfermos se distribuyeron en base a la presencia o ausencia de actividad clínica. Consideramos que había actividad cuando existía uno o más de los siguientes criterios de actividad de la ARA modificados (119,332): 1) artritis, 2) serositis, 3) erupción cutánea y/o vasculitis, 4) miositis, 5) alteraciones neuropsiquiátricas (no atribuibles a la terapéutica), 6) nefropatía activa (120,127), 7) trombocitopenia ( $<100.000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$ ) y 8) anemia hemolítica.

En base a estos criterios obtuvimos 43 pacientes en fase activa de la enfermedad y 49 en periodo inactivo.

#### 4.1.2 **Grupo control de personas sanas**

Este grupo estaba formado por 100 personas sanas (45 hombres y 55 mujeres) donantes voluntarios de sangre del Hospital Clínic i Provincial, todos ellos con serología luética negativa. La edad media del grupo era de  $43,7 \pm 14,4$  años (límites: 22 - 53 años).

## 4.2 METODOS DE LABORATORIO

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les han determinado los AAF empleando diversas técnicas, así, hemos valorado el AL mediante diversas pruebas coagulométricas y la detección de AAF específicos mediante técnica de ELISA empleando una amplia batería de fosfolípidos. Como ya hemos comentado en el capítulo precedente, uno de los objetivos principales de esta Tesis ha sido el desarrollar una nueva técnica de ELISA empleando tromboplastina parcial como antígeno. Además, en este capítulo detallamos la metodología empleada en la valoración de los diversos parámetros inmunológicos que hemos determinado en nuestros enfermos.

### 4.2.1 Anticoagulante lúpico

Las pruebas coagulométricas empleadas para la detección del AL han sido las siguientes:

#### 4.2.1 Pruebas de coagulación rutinarias

Estas pruebas incluían el *tiempo de protrombina* y el *tiempo de tromboplastina parcial activado* (TTPA). Si la relación entre el TTPA del plasma problema y el del plasma normal era superior a 1,17 se consideró la presencia de un AL o de un déficit factorial. Con la finalidad de descartar este último, en los casos de alteración de estas pruebas se procedió a la incubación del plasma problema con plasma normal (1:1, v/v) durante una hora, con una nueva determinación posterior de las mismas. Si persistía la

alteración considerábamos que estábamos delante de un AL (333).

#### 4.2.2 Tiempo de Caolín (TC)

Incubación de 0,2 ml del plasma problema con 0,1 ml de una suspensión de caolín (20 mg/ml en ClNa 0,9 gr/dl) durante 3 minutos a 37°C. A continuación se añade 0,1 ml de Cl<sub>2</sub>Ca (0,03 M) y se determina el tiempo de coagulación. En base al grupo control sano, el valor medio fue de 75,70 ± 14,30 segundos y se consideró patológico un TC >+3 DE, o sea superior a 120 segundos.

#### 4.2.3 Tiempo de inhibición de la tromboplastina tisular diluida (TITD)

Incubación a 37°C de 0,1 ml del plasma problema con 0,1 ml de una dilución a 1/500 de tromboplastina de conejo (Simplastin<sup>R</sup>, General Diagnostics) en ClNa 0,9 gr/dl durante 5 minutos. Se añade a continuación 0,1 ml de Cl<sub>2</sub>Ca 0,025 M y se determina el tiempo de coagulación. En base al grupo control consideramos patológico una relación TITD problema/TITD grupo control sano >+3 DE, o sea superior o igual a 1.3.

#### 4.2.4 Tiempo del veneno de víbora de Russell diluido (TVVRD)

El veneno de víbora de Russell se reconstituye con 2 ml de suero salino y se diluye (1/200) en tris-buffer salino. Como fuente de fosfolípido se utiliza tromboplastina parcial de origen bovino (Thrombofax<sup>f</sup>, Ortho) diluido (1/8) en tris-buffer salino (ClNa 0,15 M, tris 0,02 M, pH: 7.4). A continuación se incubaba 0,1 ml del plasma problema con 0,1 ml del veneno de

víbora de Russell y 0,1 ml de fosfolípido diluido durante 30 segundos a 37°C. Posteriormente se añade 0,1 ml de  $Cl_2Ca$  0,03 M y se determina el tiempo de coagulación. La normalidad en relación al grupo control fue  $22.7 \pm 1.1$  y se consideró patológico, asimismo, un TVVRD  $> +3DE$ , o sea superior a 26 segundos.

La prolongación del TVVRD en aquellos pacientes con un AL se normaliza cuando se sustituye la fuente de fosfolípido empleada por plaquetas lavadas y tratadas con ionóforo (20). Para ello, es preciso, en primer lugar obtener plasma rico en plaquetas centrifugando la sangre descoagulada con citrato a 150 g durante 15 minutos a temperatura ambiental. El plasma obtenido de esta forma se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 1500 g en un tampón tris-EDTA ( $ClNa$  0,15 M, tris 0,02 M, EDTA 0,001 M y glucosa 0,05 M, pH:7,4). A continuación, las plaquetas se diluyen en una concentración de  $8 \cdot 10^{10}/dl$  en el mismo tampón pero sin EDTA. Posteriormente se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiental con 1 micromol de una solución 5mM de ionóforo A23187 en etanol (concentración final: 2,5 micromolar). Una vez acabado el proceso de tratamiento del ionóforo, se sustituye en la realización del TVVRD el Thrombofax<sup>r</sup> por una suspensión de 0,1 ml de plaquetas tratadas con ionóforo (333).

#### 4.2.2 Detección de anticuerpos antifosfolípido específicos por técnica de enzimoimmunoensayo (E.L.I.S.A.)

Actualmente, el ELISA es la técnica de laboratorio aceptada universalmente como la más idónea en la determinación de los AAF (23,24). En nuestro estudio hemos empleado la técnica de ELISA en doble piso (figura 3) para su valoración. En una primera etapa hemos realizado los diferentes ensayos destinados a obtener las condiciones óptimas en nuestro laboratorio para la detección de los AAF. A continuación detallamos el protocolo seguido para obtener las condiciones más adecuadas para cada uno de los ensayos empleados.

##### 4.2.2.1 Fijación de los diferentes fosfolípidos

Los diferentes fosfolípidos empleados han sido la *cardiolipina*, *fosfatidilserina*, *ácido fosfatídico*, *fosfatidilinositol* y *tromboplastina parcial*. La fijación de los mismos a las placas de ELISA constituye la etapa fundamental en el desarrollo de la prueba. Esta depende de varios factores como son: a) el disolvente utilizado para diluir el fosfolípido; b) el volumen de la disolución y la concentración de fosfolípido empleada; c) la metodología empleada para fijar el fosfolípido a la placa y, d) el tipo de placa usada.

##### 4.2.2.1.1 *Fijación de la tromboplastina*

La tromboplastina utilizada ha sido un preparado comercial de origen bovino (activated Thrombofax<sup>®</sup>, Ortho). Hemos empleado varios disolventes y

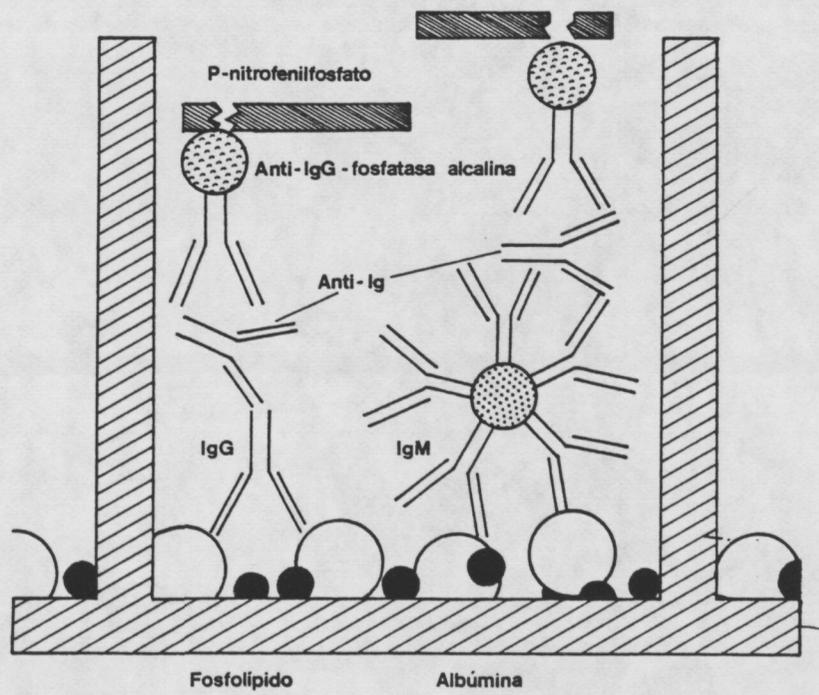


Figura 3. Esquema del ELISA en fase sólida de doble capa

diversos tipos de placas comerciales, a fin de obtener aquellos que permitan una mejor fijación de la tromboplastina en el fondo de los pocillos de las placas de ELISA. En las pruebas previas observamos que el etanol era el disolvente que permitía la dilución más adecuada de la tromboplastina. El Thrombofax<sup>r</sup> es una mezcla de fosfolípidos y proteínas de origen animal, circunstancia que plantea diferencias técnicas en relación con el empleo de fosfolípidos puros como la cardiolipina o la fosfatidilserina, ya que las placas habituales para ELISA sufren un tratamiento en su fabricación para facilitar la adhesión de las inmunoglobulinas. Este hecho afecta poco la fijación de fosfolípidos puros, pero mucho en el caso de la tromboplastina. Después de probar diversos tipos de placas, observamos que las placas para cultivo celular (Nunclón Delta, Nunc<sup>r</sup>, Dinamarca), son las que permiten una mejor fijación de la tromboplastina. La fijación de la alícuota de tromboplastina en las placas se obtenía dejándolas evaporar en la nevera a 4°C durante 12 horas.

#### 4.2.2.1.2 *Fijación de los otros fosfolípidos*

Para la dilución de la cardiolipina (Sigma<sup>r</sup>) empleamos etanol (23,..) puro mientras que para la fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol (Sigma<sup>r</sup>), usamos una mezcla de alcohol metílico y cloroformo (3:1, v/v) (183,184). La evaporación en nevera a 4°C así como el mismo tipo de placas comerciales, demostraron ser igual de eficientes que en el caso de la tromboplastina para la fijación óptima de los diversos fosfolípidos.

Posteriormente efectuamos diversos ensayos para determinar la cantidad óptima de tromboplastina y de los otros fosfolípidos para fijar en las placas.

#### 4.2.2.2 Bloqueo de las uniones inespecíficas

Con el fin de evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a las paredes de la placa, añadimos en cada pocillo una solución de tampón fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS) y suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS). Esta solución se prepara mezclando 9 volúmenes de PBS con 1 de FBS. Efectuamos diversas pruebas para determinar la cantidad óptima de la misma y el tiempo y la temperatura de la incubación posterior.

#### 4.2.2.3 Unión con el suero problema

A continuación se añade el suero problema. Los diversos ensayos fueron dirigidos a obtener la concentración óptima así como el tiempo y la temperatura adecuadas de la incubación posterior.

#### 4.2.2.4 Unión con el primer anticuerpo

En cada pocillo se añade anticuerpo de cabra (IgG) con especificidad anti-inmunoglobulina humana IgG o IgM (goat anti-human IgG o IgM, Tago Inc.).

#### 4.2.2.5 Unión con el segundo anticuerpo

Posteriormente se añade anticuerpo de conejo con especificidad anti-IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (rabbit anti-goat IgG, Sigma). También efectuamos diferentes pruebas para obtener la concentración óptima así como el tiempo y la temperatura adecuadas la incubación.

#### 4.2.2.6 Unión con el sustrato

El sustrato utilizado ha sido el p-nitrofenilfosfato (PNP) diluido en tampón dietanolamina (DEA, pH: 9,8) en una concentración de 1mg/ml, que es la concentración adecuada para este tipo de sustrato. Las pruebas posteriores fueron encaminadas a determinar tanto la cantidad de la disolución como el tiempo y temperatura de incubación de la etapa.

#### 4.2.2.7 Lectura de las densidades ópticas

La reacción anterior se para con la adición de una disolución de NaOH 3M y se mide la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 405 nanómetros de longitud de onda en un lector automático de placas de ELISA (Organon).

#### 4.2.2.8 Asignación de unidades a los resultados

Con la finalidad de asignar a los resultados obtenidos unas unidades de cálculo sencillo, estas se expresan como *índice de unión (IU)*, según la fórmula:

$$IU (\text{suero problema}) = \frac{DO(\text{suero problema}) - DO(\text{pocillos blancos})}{DO(\text{grupo control}) - DO(\text{pocillos blancos})}$$

La DO del suero problema es la media de las DO de los tres pocillos. La unidad (IU = 1) equivale a una DO del suero problema igual a la del grupo control sano. Como controles de calidad de la técnica usamos sueros positivos.

En el caso de la cardiolipina, empleamos sueros de referencia con cantidades conocidas de ACL, preparados en el *Lupus Research Unit* del Hospital St. Thomas de Londres y que amablemente nos cedió el Dr. E.N. Harris, responsable del proyecto KAPS. En el caso de los otros fosfolípidos y de la tromboplastina, utilizamos como controles positivos aquellos pacientes que habían mostrado las DO más altas en los estudios preliminares.

#### 4.2.3 Serología luética falsamente positiva

Para su determinación hemos empleado la prueba reagínica de aglutinación en porta llamada RPR (*Rapid plasma reagin*) con reactivos comerciales (RPR-carbón-cromatest<sup>f</sup>, Knickerbocker, S.A.E.).

#### 4.2.4 Anticuerpos anti-ADN nativo

Los Ac anti-ADN nativo han sido determinados por RIA en base a la técnica de Farr (334) y comercializada por Amersham (Inglaterra, código IM-76). Los valores de normalidad, según el Laboratorio de Inmunología de nuestro hospital, comprenden cifras inferiores a 25 mU/ml.

#### 4.2.5 Anticuerpos anti-ENA

Entre los diferentes anticuerpos anti-ENA, hemos determinado los *anti-Ro (SS-A)*, *anti-La (SS-B)*, *anti-Sm* y *anti-RNP*.

La detección de los anticuerpos anti-Ro y anti-La se hizo empleando una técnica de contrainmunolectroforesis. Para la detección de los anti-Sm y anti-RNP, se ha efectuado la inmunodifusión doble. Asimismo, estas técnicas se efectúan de forma rutinaria en el Laboratorio de Inmunología de nuestro hospital, empleando pautas estandarizadas con placas comerciales (Behring diagnostics<sup>f</sup>) (335,336).

#### 4.2.6 Factores del complemento

Los valores de  $C_3$  y  $C_4$  han sido determinados por inmunodifusión radial, empleando placas comerciales (Behringwerke<sup>5</sup>). Los valores de normalidad oscilan entre 80-140 mg/dl para el  $C_3$  y 20-50 mg/dl para el  $C_4$ . Las cifras inferiores a 70 y 15 mg/dl han sido consideradas patológicas.

El  $CH_{50}$  mide el complemento desde el punto de vista global. Para su determinación se ha empleado la técnica de Lachmann (133). Los valores de normalidad oscilan entre 400-700 U.U. Los valores inferiores a 300 U.U. han sido considerados patológicos.

#### 4.2.7 Otras determinaciones

Los parámetros de laboratorio habituales como la creatinina, proteínas plasmáticas, hemograma, etc. han sido determinados a través del Laboratorio de Bioquímica de nuestro hospital, empleando técnicas comerciales estandarizadas.

### 4.3 METODOS ESTADISTICOS

#### 4.3.1 Sensibilidad, Especificidad, Valores de predicción negativo y positivo, Eficacia y Odds Ratio.

A través del empleo de tablas binarias (tabla 4) hemos calculado la sensibilidad, especificidad, valores de predicción positivo y negativo, eficacia y odds ratio para las distintas pruebas analizadas (338-343).

*Sensibilidad (S)*: Probabilidad de que la prueba sea positiva cuando la alteración esta presente.

$$S = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Total de pac. con la alteración}} = \frac{a}{a + c}$$

*Especificidad (E)*: Probabilidad de que la prueba sea negativa cuando no existe la alteración analizada.

$$E = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Total de pac. sin la alteración}} = \frac{d}{b + d}$$

*Valor de predicción positivo (VP+):* Probabilidad de que la alteración analizada exista cuando la prueba sea positiva.

$$VP+ = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verd positiv} + \text{Falsos positiv}} = \frac{a}{a + b}$$

*Valor de predicción negativo (VP-):* Probabilidad de que la alteración analizada no exista cuando la prueba resulta negativa.

$$VP- = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Falsos negativ} + \text{Verd positiv}} = \frac{d}{c + d}$$

*Eficacia (Ef):* Proporción de resultados correctos.

$$Ef = \frac{\text{Verd positiv} + \text{Verd negativ}}{\text{Total de casos}} = \frac{a + d}{N}$$

*Odds Ratio (OR):* Cociente entre la razón de enfermos expuestos al factor de riesgo y la razón de los que no lo están.

$$OR = \frac{a/c}{b/d}$$

### 4.3.2 Media aritmética y desviación estandar

En todos los grupos estudiados, la media aritmética ( $\bar{x}$ ) y la desviación estandar (DE) de los diferentes parámetros estudiados han sido definidas de la siguiente manera:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_N}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} = \frac{\Sigma x_i}{N}$$

en donde  $N$  es el número de datos y  $x_i$  el valor de cada una de ellas.

$$DE = \sqrt{\frac{\Sigma x_i^2 - N\bar{x}^2}{N - 1}} = \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{N - 1}}$$

en donde  $x$  representa las desviaciones de cada uno de los valores  $x_i$  respecto a la media ( $\bar{x}$ ).

Tabla 4. Modelo de tabla binaria

		ALTERACION O PATOLOGIA	
		PRESENTE	AUSENTE
FACTOR DE RIESGO O PRUEBA	POSITIVO	Verdadero positivo (a)	Falso positivo (b)
	NEGATIVO	Falso negativo (c)	Verdadero negativo (d)

### 4.3.3 Comparación de caracteres cualitativos

#### 4.3.3.1 Análisis Univariado

##### 4.3.3.1.1 *Prueba de la $X^2$*

Para determinar la relación entre dos caracteres cualitativos con datos independientes (factor de riesgo versus patología) hemos empleado la prueba de la  $X^2$ , según la fórmula (341):

$$X^2 = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^e (n_{oi} - n_{ci})^2}{n_{ci}}$$

en donde  $n_o$  es el número de frecuencias observadas y  $n_c$  el número de frecuencias calculadas. El valor obtenido se compara con la ley de  $X^2$  con  $v = (K - 1) (1-1)$  grados de libertad.

En el caso particular  $K = 1 = 2$ , es decir, caracteres cualitativos con dos categorías estudiadas, hemos empleado la tabla de contingencia  $2 \times 2$ .

La significación se obtiene en las tablas científicas Geigy (342) de la distribución  $X^2$  para  $v = K - 1$  grados de libertad y riesgo alfa = 0,05. Hemos aceptado como significación estadística válidos valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.1.2 Prueba exacta de Fisher

Para muestras pequeñas, cuando las frecuencias calculadas son iguales o inferiores a 3, hemos aplicado la prueba exacta de Fisher, según la fórmula (343):

$$F = \frac{n_{11}! \cdot n_{12}! \cdot n_{c1} \cdot n_{c2}}{n_{o1}! \cdot n_{o2}! \cdot n_{o3}! \cdot n_{o4}! \cdot n_t}$$

en donde  $n_o$  es cada una de las frecuencias observadas,  $n_{11}$  es el total de enfermos con el factor de riesgo,  $n_{12}$  es el total de enfermos sin el factor de riesgo,  $n_{c1}$  es el total con la patología,  $n_{c2}$  es el total sin la patología y  $n_t$  el total absoluto. Hemos aceptado como significación estadística válida valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.2 Análisis Multivariado. Análisis discriminativo por pasos.

Para determinar el grado de la relación entre diversos caracteres cualitativos con datos independientes hemos aplicado el análisis discriminativo por pasos ("stepwise discriminant analysis"), empleando el paquete estadístico BMDP (344). Asimismo, hemos aceptado como significación estadística valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4 Intervalo de Confianza

El intervalo de confianza (IC) proporciona los valores límites entre los cuales se encuentra la diferencia entre dos proporciones o medias que ha sido encontrada como estadísticamente significativa.

En este trabajo hemos utilizado el intervalo de confianza al 95% entre dos proporciones, según la fórmula (345):

$$IC = p \pm (1,96 \times \sqrt{p \times (1-p)/n})$$

en donde  $p$  es la proporción o diferencia encontrada en el estudio y  $n$  el número de enfermos analizados.

#### 4.3.5 Distribuciones de las variables continuas

##### 4.3.5.1 Distribución Normal

Para verificar la hipótesis de normalidad de la distribución de las variables continuas (distribución Gaussiana) estudiadas en las muestras pequeñas ( $N < 30$ ) de la población de los diferentes grupos, hemos empleado la prueba de Kolmogorov-Smirnov (341).

Esta prueba verifica la hipótesis de normalidad de distribución de una variable cuantitativa continua, calculando las diferencias ( $D_i$ ) existentes entre los porcentajes acumulados ( $P_i$ ), correspondientes a los

valores  $x_i$  del carácter observados en la muestra y los porcentajes acumulados ( $S_i$ ) correspondientes al mismo valor  $x_i$ , en el supuesto de que esta muestra siga una ley normal ( $m, \sigma^2$ ). Dado que no se conoce la media ( $M$ ) ni la varianza ( $\sigma^2$ ) de la población, se utiliza la media ( $\bar{x}$ ) y la varianza ( $s^2$ ) observadas en la muestra, como una oscilación de  $M$  y  $\sigma^2$  de la población.

Los valores límites de estas diferencias  $D(N, \alpha)$  en función del tamaño de la muestra ( $N$ ) y para un riesgo  $\alpha = 0,05$  y  $0,01$  vienen dados por las tablas de Lilliefors (341).

#### 4.3.5.2 Distribución Log-normal

La distribución logarítmico normal o log-normal es asimétrica y presenta las siguientes características:

$$\text{Moda} = \text{antilog} (M_{\log K} - 2,3026 \sigma^2_{\log K})$$

$$\text{Mediana} = \text{antilog} M_{\log K}$$

$$\text{Media} = \text{antilog} (M_{\log K} + \sigma^2_{\log K})$$

Si se inscribe  $x$  en una escala logarítmica de abscisas  $o$ , lo que es lo mismo,  $\log x$  en una escala lineal de abscisas, la distribución asimétrica se hace normal simétrica (342).

**4.3.6. Prueba de homogeneidad de variables cuantitativas. Prueba no paramétrica de Mann-Whitney**

Para la comparación de dos medias observadas en muestras grandes con datos independientes y distribución no normal, hemos aplicado la prueba no paramétrica del índice U de Mann-Whitney (341):

$$U_{12} = \frac{n_1 \cdot n_2 + n_1 \cdot (n_1 + 1)}{2 - R_1}$$

$$U_{21} = \frac{n_1 \cdot n_2 + n_2 \cdot (n_2 + 1)}{2 - R_2}$$

y se cumple que  $U_{12} + U_{21} = n_1 \cdot n_2$

Para ello es preciso transformar la variable cuantitativa en ordinal.  $R_1$  es la suma de todos los números del grupo 1 y  $R_2$  la del grupo 2, mientras que  $n_1$  y  $n_2$  son el número de individuos de cada grupo.

La significación estadística ha sido obtenida en las tablas científicas Geigy (342), observando el valor de U para el número de individuos y un riesgo alfa = 0,05. Si el índice U mínimo calculado es inferior al de la tabla, la diferencia entre los grupos es significativa a nivel de  $p < 0,05$ .

#### 4.3.7 Coeficiente de correlación lineal de Pearson

El coeficiente de correlación  $r_{xy}$  permite estudiar la relación entre dos variables cuantitativas y determinar si la magnitud de una de ellas (variable dependiente) está en relación con la otra (variable independiente) y viceversa. Es un índice del grado con que una distribución de dos variables  $X$  e  $Y$  se adaptan a una línea recta. Si los valores de  $Y$  (variable dependiente) tienden a incrementarse cuando aumenta  $X$  (variable independiente) diremos que la correlación es directa o positiva. Si el valor de  $Y$  disminuye cuando aumenta  $X$  la correlación es inversa o negativa. Este coeficiente varía entre  $-1$  y  $+1$ . Mide la intensidad de la relación cuando dos variables se distribuyen normalmente y se calcula con la fórmula (341):

$$r_{xy} = \frac{(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{(x - \bar{x})^2 \cdot (y - \bar{y})^2}}$$

La significación estadística se obtiene en las tablas científicas Geigy (344) para  $v = n - 2$  grados de libertad.

La relación entre las dos variables cuantitativas se representa por su recta de regresión cuya expresión matemática es la ecuación:

$$Y = a + bX$$

en la que  $a$  es el valor de la ordenada en el punto de intersección de la línea de regresión y  $b$  el coeficiente de regresión, el cual representa la pendiente de la recta, es decir, la cifra por la que debe multiplicarse cada valor de  $X$  para obtener  $Y$ . Los valores de  $a$  y  $b$  se obtienen por el método de mínimos cuadrados.

#### 4.3.8 Soporte Informático

La información de las hojas de recogida de datos de cada enfermo fue almacenada en uno de los ordenadores IBM del Servicio de Medicina Interna del H.C.P. Los diferentes cálculos de esta Tesis Doctoral han sido efectuados con la ayuda de los programas comerciales EPSTAT y el paquete estadístico BMDP.

## V. RESULTADOS

### 5.1 ANALISIS CLINICO DE LA SERIE

La serie estaba constituida por 92 pacientes con LES, de los cuales 84 eran mujeres (91%) y 8 varones (9%). La edad media de la serie ( $\pm$  DE) fue de  $32.5 \pm 14.3$ , con unos límites entre 14 y 66 años. La sintomatología inicial atribuible al LES se presentó fundamentalmente entre la segunda y tercera década de la vida, y únicamente 11 enfermos (12%) la iniciaron después de los 50 años. El tiempo medio ( $\pm$  DE) de evolución de la enfermedad fue de  $7.44 \pm 4.45$  años, con unos límites entre los 6 meses y 21 años.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes a lo largo de la evolución de la enfermedad se detallan en la figura 4. Destaca la incidencia de artritis en 63 (68 %) y las manifestaciones cutáneas con 50 (54 %), principalmente eritema en vespertilio.

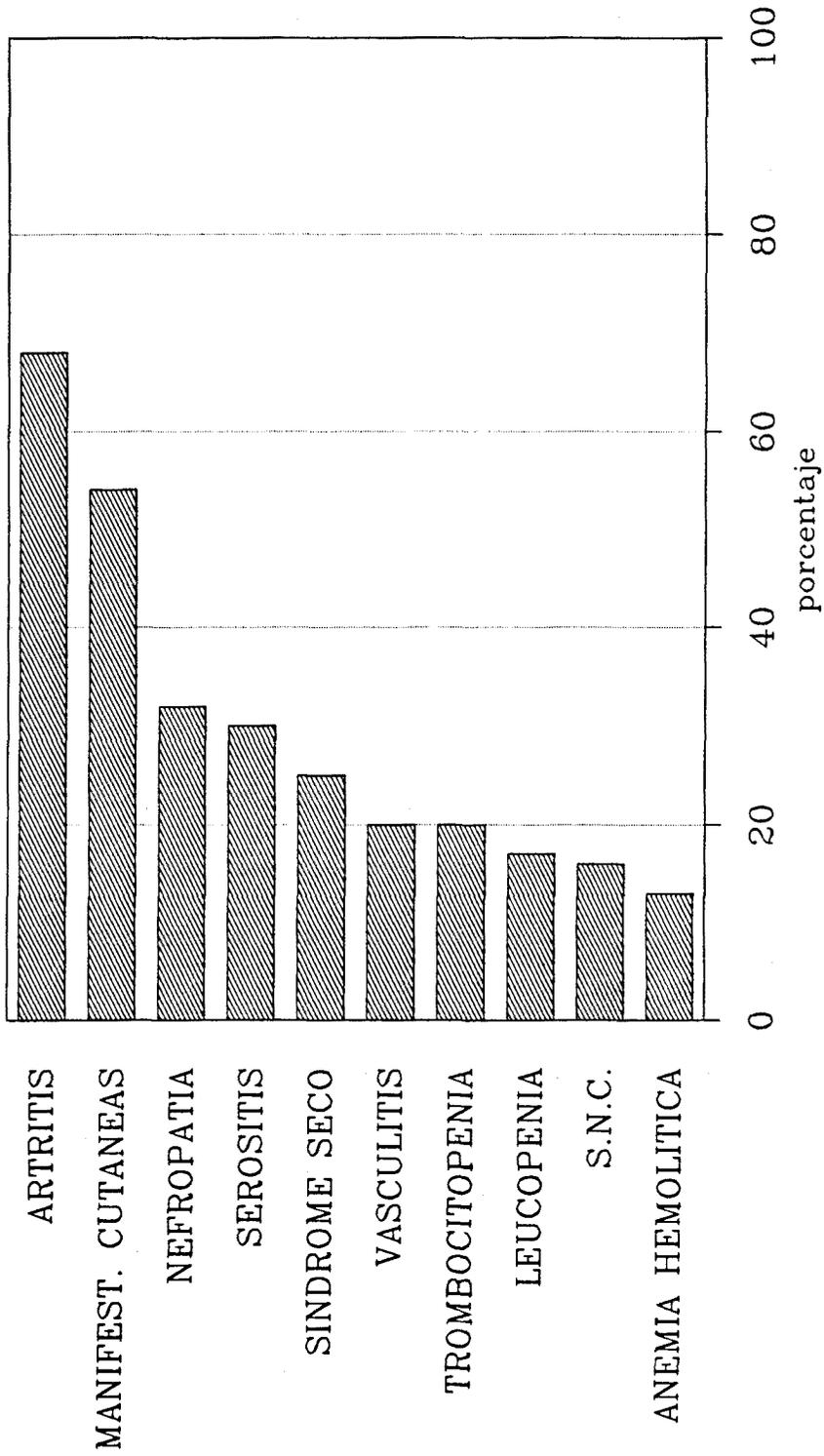


Figura 4. Manifestaciones clinicas de la serie

## 5.2 ESTUDIO DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO

Los resultados de este estudio los podemos dividir en tres grandes apartados: la estandarización de las distintas técnicas de ELISA para detectar AAF (5.2.1); el análisis de la incidencia de los distintos AAF (5.2.2); y, finalmente, las asociaciones entre los AAF y las diferentes manifestaciones clínicas y biológicas en LES (5.2.3).

### 5.2.1 Estandarización final de las técnicas de ELISA

La estandarización de las distintas técnicas de ELISA para la determinación de los AAF ha seguido tres pasos bien diferenciados: en primer lugar, la obtención de las condiciones óptimas para la realización de las distintas técnicas en nuestro laboratorio (5.2.1.1); en segundo lugar, la asignación a los resultados de unas unidades de cálculo sencillo (5.2.1.2); y, finalmente, la determinación de los valores de normalidad para las distintas pruebas (5.2.1.3).

Las diferentes técnicas desarrolladas en nuestro laboratorio se detallan a continuación. Tras probar distintas concentraciones, las condiciones óptimas han sido las siguientes:

#### 5.2.1.1 *Fijación de los fosfolípidos*

En el caso de la tromboplastina (Thrombofax<sup>R</sup>), se diluye en etanol a una concentración de 1:20 (v/v) y se añaden 30 µl de esta dilución. En la dilución de la cardiolipina (Sigma<sup>R</sup>), utilizamos también etanol hasta obtener una concentración de 50 µg/ml y, añadimos 30 µl de esta dilución. La cantidad resultante de cardiolipina fijada en cada pocillo es de 1,5 µg. En el caso de la fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfatidilinositol (Sigma<sup>R</sup>), se diluyen en una mezcla de metanol y cloroformo (3:1, v/v), hasta obtener una concentración de 60 µg/ml. Añadimos 25 µl de la dilución anterior, de forma que la cantidad fijada de fosfolípido en cada pocillo es de 1,5 µg.

La fijación definitiva de los distintos fosfolípidos en los pocillos se obtiene por evaporación a 40°C en nevera durante 16 horas.

#### 5.2.1.2 *Bloqueo de las uniones inespecíficas*

Este se consigue añadiendo 200 µl de la disolución de PBS-FBS en cada pocillo. Después, las placas se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, los pocillos se lavan con PBS (120 µl en cada uno y los agitamos durante 2 minutos), esta operación se repite tres veces.

#### 5.2.1.3 *Unión con el suero problema*

A continuación se añade por triplicado 100  $\mu$ l de cada suero problema, de una dilución 1/100 en PBS-FBS. Para la comparación de los resultados utilizamos varios pocillos (pocillos blancos) en los que únicamente se añaden 100  $\mu$ l de la disolución de PBS-FBS. La placa se incuba durante 2 horas a la temperatura del laboratorio y se vuelven a lavar los pocillos con PBS, como en el apartado previo.

#### 5.2.1.4 *Unión con el primer anticuerpo*

Finalizado el lavado añadimos un anticuerpo (IgG) con especificidad anti-inmunoglobulina humana IgG o IgM (Tago Inc<sup>R</sup>). Colocamos una alícuota de 100  $\mu$ l de una disolución 1/2000 en PBS-FBS. El tiempo de incubación de este paso es de una hora a temperatura ambiente, tras el que volvemos a lavar de nuevo los pocillos con PBS.

#### 5.2.1.5 *Unión con el segundo anticuerpo*

Añadimos el anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina, 75  $\mu$ l de una dilución al 1/1000 en PBS-FBS. Tras efectuar pruebas a distintas temperaturas, encontramos que la más adecuada es una hora en estufa a 25°C y después se procede a lavar los pocillos con 120  $\mu$ l de una dilución de tampón

dietanolamina (DEA, pH: 9,8).

#### 5.2.1.6 *Unión con el substrato*

Como substrato se utiliza p-nitrofenilfosfato, el cual se diluye en tampón dietanolamina (1 mg/ml). En cada pocillo se añaden 75 µl de esta dilución y se incuba a oscuras durante una hora.

#### 5.2.1.7 *Lectura de las densidades ópticas*

La reacción anterior se detiene con la adición de 50 µl de una disolución de hidróxido sódico 3 M.

#### 5.2.1.8 *Determinación de los valores de normalidad*

Para calcular los valores de normalidad o de referencia, determinamos el IU de los 100 sueros del grupo control de personas sanas para cada fosfolípido empleado, tanto para el isotipo IgG como el IgM. Los resultados de las medias de los IU del grupo seguían una distribución asimétrica. Estos valores seguían una distribución normal cuando convertíamos el IU en su logaritmo (distribución log-normal). Para referir los valores patológicos hemos considerado tres niveles de positividad: bajo, moderado y alto. Hemos considerado un nivel positivo bajo (+), cuando

el IU estaba comprendido entre 3 y 5 DE; positivo moderado (++) entre 5.1 y 7 DE; y finalmente positivo alto (+++) cuando el IU era > 7 DE.

De acuerdo con esta clasificación, las distribuciones de los valores normales y patológicos para cada fosfolípido en función del IU, son las que se muestran en las tablas 5-8.

#### 5.2.1.9. *Coefficientes de variación intraensayo e interensayo*

Para evaluar la reproductividad de las distintas técnicas de ELISA empleadas, calculamos los diferentes coeficientes de variación (CV) tanto intraensayo como interensayo, referidos a los sueros positivos de control. El CV se calcula según la fórmula:

$$CV (\%) = \frac{DE}{\text{media DO}} \times 100$$

En la tabla 11, se muestran los distintos CV para las distintas pruebas empleadas. Los CV intraensayo fueron inferiores al 8% y al 14% para los CV interensayo, en todos los tests empleados. Estos resultados confirman la reproductibilidad y fiabilidad de las técnicas de ELISA empleadas para la detección de AAF.

TABLA 5. Distribución de los valores de normalidad para los Ac anti-TP por ELISA en función del IU y la DO.

	<i>ATP IgG</i>	<i>ATP IgM</i>
<i>IU normal</i>	0.963 ± 0.42	0.923 ± 0.47
<i>IU patol</i>	> 2.3	> 2.35
<i>DO normal</i>	124 ± 20	75.24 ± 15.4
<i>DO patol</i>	> 270	> 175

**TABLA 6. Distribución de los valores patológicos para los Ac anti-TP por ELISA en función del IU.**

	<i>positivo débil</i> (IU>3 e <5DE)	<i>moderado</i> (IU>5 e <7DE)	<i>fuerte</i> (IU > 7DE)
<i>IgG</i>	2.3 - 3.06	3.07 - 3.9	> 3.91
<i>IgM</i>	2.4 - 3.27	3.28 - 4.2	> 4.21

TABLA 7. Distribución de los valores de normalidad para el isotipo IgG de los Ac anti-CL, anti-FS y anti-FI por ELISA en función del IU y la DO.

	<i>ACL</i>	<i>AFS</i>	<i>AFA</i>	<i>AFI</i>
<i>IU normal</i>	0.9 ±0.4	0.81 ±0.4	1.03 ±0.4	0.96 ±0.36
<i>IU patol</i>	>2.1	>2.01	>2.23	>2.04
<i>DO normal</i>	170 ±15	162.9 ±18	86.35 ±17	97.9 ±16
<i>DO patol</i>	>240	>205	>170	>190

TABLA 8. Distribución de los valores de normalidad para el isotipo IgM de los Ac anti-CL, anti-FS y anti-FI por ELISA en función del IU y la DO.

	<i>ACL</i>	<i>AFS</i>	<i>AFA</i>	<i>AFI</i>
<i>IU normal</i>	0.96 ±0.42	0.93 ±0.38	0.93 ±0.5	0.94 ±0.53
<i>IU patol</i>	>2.22	>2.07	>2.43	>2.53
<i>DO normal</i>	150 ±15	150.8 ±9.5	43.08 ±13	54 ±10
<i>DO patol</i>	>225	>180	>114	>100

TABLA 9. Distribución de los valores patológicos para el isotipo IgG los Ac anti-CL, anti-FS, anti-AF y anti-FI por ELISA en función del IU.

	<i>positivo débil</i> (IU>3 e <5DE)	<i>moderado</i> (IU>5 e <7DE)	<i>fuerte</i> (IU > 7DE)
<i>ACL</i>	2.1 - 2.9	2.91 - 3.7	> 3.71
<i>AFS</i>	2.01 - 2.81	2.82 - 3.61	> 3.61
<i>AFA</i>	2.23 - 3.03	3.04 - 3.83	> 3.84
<i>AFI</i>	2.04 - 2.76	2.77 - 3.48	> 3.49

TABLA 10. Distribución de los valores patológicos para el isotipo IgM de los Ac anti-CL, anti-FS, anti-AF y anti-FI por ELISA en función del IU.

	<i>positivo débil</i> (IU>3 e <5DE)	<i>moderado</i> (IU>5 e <7DE)	<i>fuerte</i> (IU > 7DE)
<i>ACL</i>	2.22 - 3.06	3.07 - 3.9	> 3.91
<i>AFS</i>	2.07 - 2.83	2.84 - 3.59	> 3.60
<i>AFA</i>	2.43 - 3.43	3.44 - 4.43	> 4.44
<i>AFI</i>	2.53 - 3.59	3.60 - 4.65	> 4.66

Tabla 11. Coeficientes de Variación (CV) intraensayo e interensayo de las distintas técnicas de ELISA empleadas.

	<i>CV intraensayo</i>		<i>CV interensayo</i>	
	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>
<i>ATP</i>	7%	6%	11%	12%
<i>ACL</i>	8%	5%	11%	13%
<i>AFS</i>	8%	4%	13%	14%
<i>AFA</i>	8%	7%	12%	12%
<i>AFI</i>	7%	4%	12%	14%

## 5.2.2 Incidencia de los distintos anticuerpos antifosfolípido en el L.E.S.

### 5.2.2.1 Incidencia del anticoagulante lúpico

En este trabajo consideramos que un paciente era portador de un AL, cuando al menos dos de las pruebas coagulométricas efectuadas eran positivas. Así, 29 pacientes (32%) tenían un AL. La distribución según la positividad de las diferentes pruebas coagulométricas empleadas se detalla en la tabla 12. Es de destacar que el TC solo se efectuó en veinte pacientes.

### 5.2.2.2 Incidencia de los Ac anti-tromboplastina

Los Ac anti-tromboplastina (ATP) fueron positivos en 32 pacientes (35%). Por isotipos, los ATP-IgG fueron positivos en 13 enfermos (14%), los ATP-IgM en 13 (14%) y 6 casos (7%) eran positivos para ambos isotipos simultáneamente. La distribución por grados de positividad se detallan en las tablas 9 y 10.

#### 5.2.2.3 Incidencia de los Ac anti-cardiolipina

Los Ac anti-cardiolipina (ACL) fueron positivos en 34 pacientes (37%). Por isotipos, los ACL-IgG se detectaron en 15 enfermos (16%), los ACL-IgM en 11 (13%) y 8 casos (8%) eran positivos para ambos isotipos. La distribución por grados de positividad se detallan en las tablas 9 y 10.

#### 5.2.2.4 Incidencia de los Ac anti-fosfatidilserina

Los Ac anti-fosfatidilserina (AFS) fueron positivos en 29 pacientes (32%). Por isotipos, los AFS-IgG se detectaron en 12 enfermos (13%), los AFS-IgM en 13 (14%) y 4 casos (4%) eran positivos para ambos isotipos. La distribución por grados de positividad se detallan en las tablas 9 y 10.

#### 5.2.2.5 Incidencia de los Ac anti-ácido fosfatídico

Los Ac anti-ácido fosfatídico (AFA) fueron positivos en 26 pacientes (28%). Por isotipos, los AFA-IgG se detectaron en 12 enfermos (13%), los AFA-IgM en 11 (12%) y 3 casos (3%) eran positivos para ambos isotipos. La distribución por grados de positividad se detallan en las tablas 9 y 10.

#### 5.2.2.6 Incidencia de los Ac anti-fosfatidilinositol

Los Ac anti-fosfatidilinositol (AFI) fueron positivos en 22 pacientes (24%). Por isotipos, los AFI-IgG se detectaron en 10 enfermos (11%), los AFI-IgM en 8 (9%) y 4 casos (4%) eran positivos para ambos isotipos. La distribución por grados de positividad se detallan en las tablas 9 y 10.

#### 5.2.2.7 Incidencia de la serología luética falsamente positiva

La serología luética falsamente positiva (RPR) fue detectada en 20 pacientes (22%).

Tabla 12. Incidencia del AL en el L.E.S. Positividad de las distintas pruebas coagulométricas para su detección.

	<i>pacientes positivos</i>	<i>porcentaje</i>
AL (+)	29	32%
<i>TProt</i>	2	2%
<i>TTPA</i>	21	23%
<i>TVVRD</i>	31	34%
<i>TITD</i>	26	28%
<i>TC*</i>	8	9%

\* El TC solo se practicó en 20 pacientes, el resto de pruebas se determinaron en el total de pacientes (n=92)

Tabla 13. Incidencia de los distintos AAF por ELISA en el L.E.S.  
Distribución según el isotipo.

	<i>Global</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>IgG+IgM</i>
<i>ATP</i>	32 (35%)	13	13	6
<i>AC</i>	34 (37%)	15	11	8
<i>AFS</i>	29 (32%)	21	3	4
<i>AFA</i>	26 (28%)	12	11	3
<i>AFI</i>	22 (37%)	10	8	4
<i>RPR</i>	20 (22%)			



Figura 5. Incidencia de los AAF en el LES

Tabla 14. Relación entre los distintos Ac antifosfolípido determinados por técnica de ELISA y el anticoagulante lúpico. Análisis multivariado.

prueba	P
ATP	<0.001
ACL	0.17
AFS	0.23
AFA	0.12
AFI	0.75
RPR	0.12

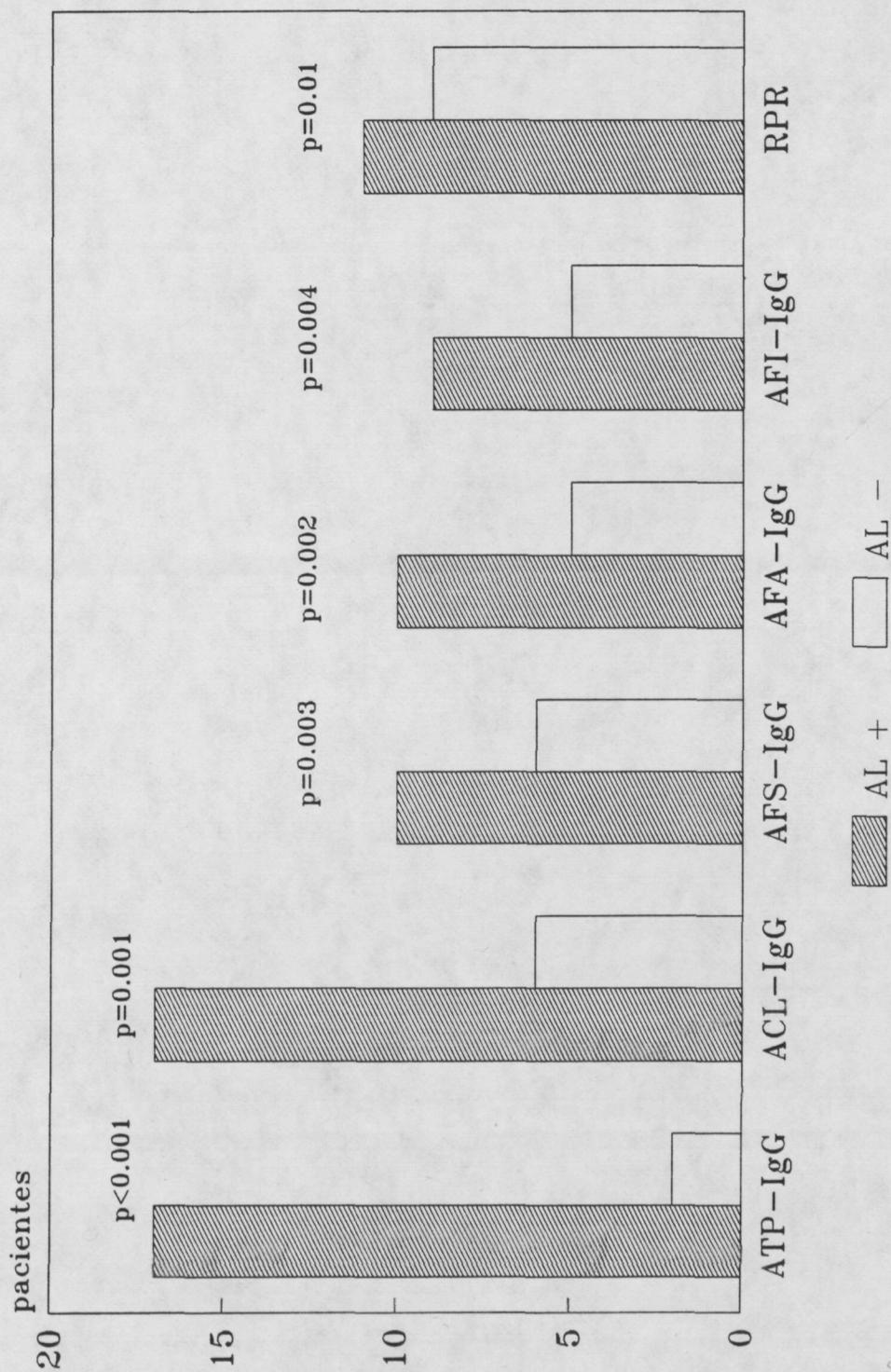


Figura 6. Correlacion entre el AL y los otros AAF por ELISA

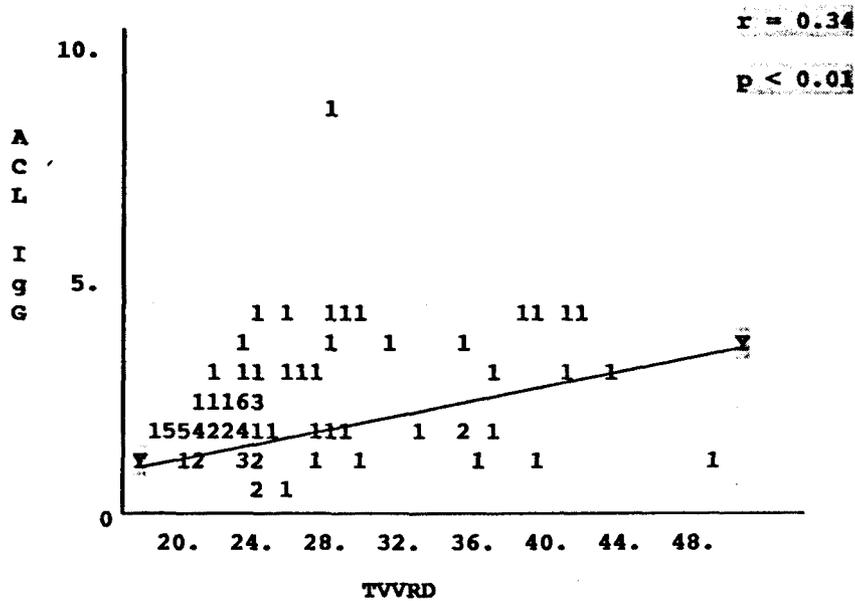
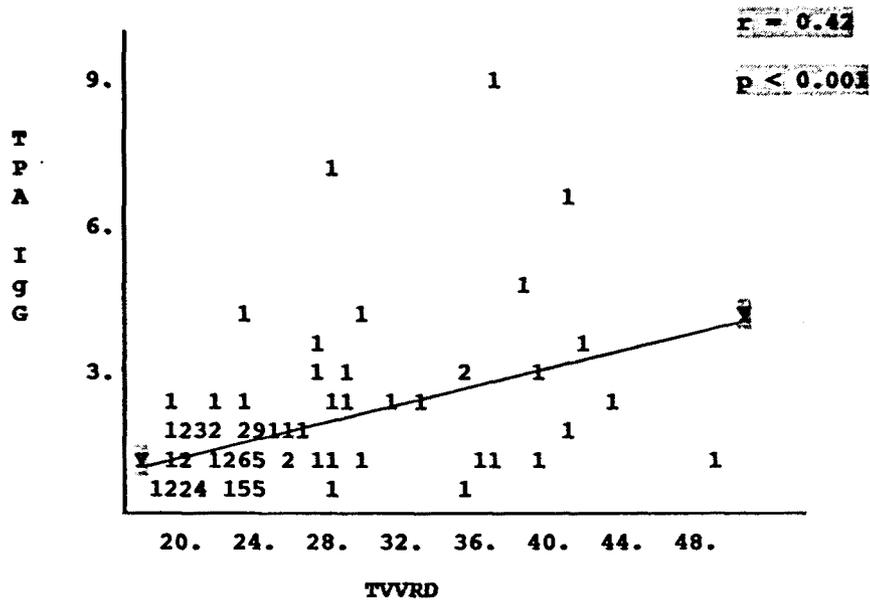


Figura 7. Correlación entre los niveles de ATP-IgG, ACL-IgG y los valores del TVVRD.