



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

DETERMINACIÓN DE ISÓTOPOS DE ANTICUERPOS
ANTICARIDIOLIPINA (Aci) LUPUS ERITEMATOSO
SISTÉMICO (LES) Y/O SÍNDROME DE ANTICUERPOS
ANTIFOSFOLIPIDO (SAAF)

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:

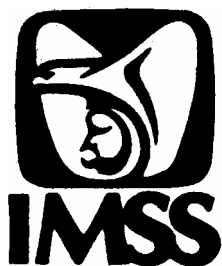
REUMATOLOGÍA

PRESENTA:

DR. DANIEL XAVIER XIBILLE FRIEDMANN

ASESOR:

DR. LUIS JAVIER JARA QUEZADA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Jesus Arenas Osuna
Jefe del Departamento de Educación e Investigación Médicas
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional La Raza
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Juan Manuel Miranda Limón
Jefe del Departamento de Reumatología
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional La Raza
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Luis Javier Jara Quezada
Asesor de Tesis
Departamento de Investigación en Epidemiología Clínica
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional La Raza
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Daniel Xavier Xibillé Friedmann
Residente del Curso de Reumatología
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional La Raza
Instituto Mexicano del Seguro Social

Número definitivo del Protocolo **2002-690-0012**

Indice

Carátula

Resumen

Abstract

Antecedentes

Material y Metodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Bibliografía

Resumen

Determinación de isotipos de anticuerpos anticardiolipina (aCl) en el líquido amniótico (LA) en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y/o síndrome de anticuerpos antifosfolípido (SAAF)

Objetivo: Determinar los niveles de anticuerpos anticardiolipina e isotipo de los mismos, así como de anticuerpos anti β 2-GP1 en el suero y en el líquido amniótico tanto de pacientes embarazadas con LES y/o SAAF, como de mujeres embarazadas sanas que sirvieran como controles.

Material y Métodos: Se analizó mediante técnica de ELISA el suero y el líquido amniótico de pacientes embarazadas con LES y/o SAAF así como de mujeres embarazadas sanas. Los resultados se compararon utilizando la prueba de t de Student.

Resultados: 6 de 13 pacientes (46.1%); 5 con LES y una con SAAF primario tuvieron anticuerpos antifosfolípido en LA. Dos pacientes tuvieron IgG aCl y 4 pacientes tuvieron anti β 2-GP1 (una de ellas tuvo también aCl IgM) en LA. En suero, 4 pacientes (30%) tuvieron anticuerpos antifosfolípido positivos (3 anti β 2-GP1 y 1 aCl IgG). Ningún control tuvo anticuerpos antifosfolípido en LA. En suero solo un control tuvo aCl IgM positivo. La presencia de anti β 2-GP1 en LA de pacientes alcanzó valores estadísticamente significativos al compararlos con controles.

Conclusiones: Los aCl y los anti-b2-GP1 pueden estar presentes en el líquido amniótico de pacientes con o sin historia de pérdida fetal. La presencia de aCl IgM y anti-b2-GP1 en líquido amniótico puede sugerir su producción local.

Abstrac

Anticardiolipin antibody (aCl) isotype determination in amniotic fluid of pregnant patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and/or antiphospholipid syndrome (APLS)

Objective: To determine the levels and isotypes of aCl, as well as of anti beta 2 glycoprotein 1 (anti β 2-GP1) antibodies in serum and amniotic fluid of pregnant patients with SLE and/or APLS, and of healthy pregnant women serving as a control group.

Material and Methods: We analyzed serum and amniotic fluid of pregnant patients with SLE and/or APLS, and of healthy pregnant women through ELISA. Results were compared using a Student's T test.

Results: 6 of 13 patients (46.1%), 5 with SLE and one with primary APLS had antiphospholipid antibodies in amniotic fluid. Two patients had IgG aCl and 4 patients had anti β 2-GP1 (one of them also showing IgM) in amniotic fluid. In serum 4 patients had (30%) had antiphospholipid antibodies present (1 IgG aCl and 3 anti β 2-GP1) as opposed to none in the control group having antiphospholipid antibodies in amniotic fluid. Only one control had IgM aCl in serum. Anti β 2-GP1 in the amniotic fluid of patients showed a statistically significant value when compared to controls.

Conclusion: aCl and anti β 2-GP1 can be present in the amniotic fluid of patients with and without a history of fetal loss. The presence of IgM aCl and anti β 2-GP1 in amniotic fluid suggests its localized production.

Antecedentes

La presencia de anticuerpos anticardiolipina (aCl) en el suero materno se ha asociado a un resultado obstétrico y perinatal adverso, incluyendo pérdidas fetales recurrentes, retardo en el crecimiento intrauterino. Estas complicaciones se asocian a insuficiencia uteroplacentaria que parecen ser la consecuencia de la interacción de los anticuerpos antifosfolípidos con el tejido placentario¹. La consecuencia del daño mediado por estos anticuerpos incluye a la vasculopatía decidual, la trombosis placentaria y el infarto placentario². Adicionalmente se ha sugerido³ que los aCl también pueden ser responsables de infartos cerebrales fetales intrauterinos o de convulsiones neonatales⁴. Estos autores postularon que la inmunoglobulina G (IgG) cruza la placenta e ingresa a la circulación fetal y puede causar eventos trombóticos en el feto. Recientemente se ha demostrado la presencia de los aCl maternos en el líquido amniótico (LA) y en la sangre cordón umbilical de fetos cuyas madres tienen síndrome de anticuerpos antifosfolípido (SAAF)⁵, aunque no se determinó algún otro anticuerpo asociado al síndrome, por ejemplo anticuerpos anti beta 2 glicoproteína 1 (antiβ2-GP1), una proteína que interviene de manera importante en la patogénia del SAAF. Otros autores⁶ no han encontrado complicaciones atribuibles a estos anticuerpos en los hijos de madres con SAAF. El estudio de los isotipos de anticuerpos anticardiolipina y la búsqueda de antiβ2-GP1 pueden ayudar a esclarecer los mecanismos patogénicos que conducen a una μορβιλιδαδ περιναταλ ελεπαδα εν λασ παχιεντες θυε στον πορταδορασ δε εστασ μολγ χυλασ δυραντε ελ εμβαραζο (παχιεντες χον ΛΕΣ ψ/ο Σ ΑΑΦ).

Ελ οβφειτω δε εστε εστυδιο φυε δετερμιναρ λος νιπελεσ δε αντιχυερποσ αντιχ αρδιολιπινα ε ισοτιπο δε λος μισμοσ, ασϋ χομο δε αντιχυερποσ αντιβ2-GP1 en el suero y en el líquido amniótico tanto de pacientes embarazadas con lupus eritematoso sistémico (LES) y/o SAAF, como de mujeres embarazadas sanas que sirvieran como controles.

MATERIAL Y METODOS

Se incluyeron sueros y muestras de líquido amniótico de mujeres embarazadas portadoras de LES clasificados según los criterios propuestos en 1982 por el American Rheumatology Association⁷, y/o SAAF clasificado según los criterios propuestos en Sapporo en 1997⁷, con edad gestacional entre las semanas 14 y 38 . Como grupo control se incluyó a mujeres embarazadas sanas con características similares. Aquellas pacientes con expedientes incompletos o sin muestras almacenadas se excluyeron del presente estudio.

Todas las pacientes se atendieron en la clínica de enfermedades Reumáticas y embarazo del departamento de Reumatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza (HECMR). En esta clínica, a cada paciente se le realiza historia clínica y exploración física general, enviándose para su control perinatal al Hospital de Ginecología y Obstetricia número 3 (HGO3) del mismo centro médico. Se les evalúa cada 4 semanas durante su embarazo y en una ocasión posterior al evento obstétrico. En cada visita se realizan los exámenes de laboratorio de rutina (biometría hemática, química sanguínea y examen general de orina) que se consideren pertinentes.

Los antecedentes generales, antecedentes gineco-obstétricos, tiempo de duración de LES y/o SAAF, activación durante el embarazo y medicamentos administrados durante el embarazo se obtuvieron de los expedientes de las pacientes y se consignaron en unas hojas diseñadas de manera expresa para ello.

Las muestras de suero y el líquido amniótico se extrajeron simultáneamente por punción venosa y por medio de amniocentesis respectivamente, tras obtener consentimiento informado en el departamento de

perinatología del HGO3. En el caso de las mujeres embarazadas que sirvieron como control se extrajo líquido amniótico mediante amniotomía realizada en los momentos previos a la cesárea electiva.

Las muestras de líquido amniótico y sangre materna se almacenaron en el laboratorio de inmunología del HECMR tras centrifugarlas (en el caso de las muestras de sangre únicamente) y congelarlas a -70°C . La determinación de los anticuerpos anticardiolipina (isotipos IgG e IgM) y anti β 2-GP1 (isotipo IgG) tanto en suero como en líquido amniótico se realizó mediante ELISA.

Los valores de referencia utilizados fueron los siguientes: En suero, aCI IgG >15 GPL, aCI IgM >12.5 MPL y anti β 2-GPI <20 UI. En líquido amniótico, aCI IgG >23 GPL, aCI IgM > 11 MPL, anti β 2GPI <20 UI. Los primeros se basan en los valores de referencia previamente estandarizados en nuestro laboratorio, mientras que los segundos se establecieron de manera arbitraria.

El análisis estadístico de tipo descriptivo empleado fue la determinación de medias y desviaciones estándar de las distintas variables, así como la prueba de t de Student para la comparación de los resultados obtenidos entre las pacientes y sus controles, tomando como valor estadísticamente significativo p igual o mayor a 0.005.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 28 muestras, tanto de suero como de líquido amniótico provenientes de 13 pacientes (10 con LES y 3 con SAAF) y 15 controles. Las características de las pacientes y de los controles se presentan en la tabla 1.

Las pacientes con SAAF no presentaron complicaciones trombóticas ni obstétricas por su enfermedad durante el embarazo. Once pacientes se sometieron a cesárea, siendo el motivo preeclampsia en 2 de ellas, cesárea previa en 2, desproporción cefalopélvica en 2, ruptura prematura de membranas en 2, hipomotilidad fetal en 1, circular de cordón en 1, sufrimiento fetal agudo en 1 y sin indicación clara en 1. Todos los controles se sometieron a cesárea por motivos puramente obstétricos.

Los niveles de aCl y sus isotipos, tanto en suero como en el líquido amniótico de las pacientes con enfermedad reumática y de los controles se presentan en la tabla 2.

Los niveles de anti β 2-GP1 en suero y líquido amniótico de pacientes control se muestra en la tabla 3.

Tabla 1. Características generales de los pacientes y de los controles

Características	Pacientes	Controles
Edad	28.8±7.6 (r=20-42)	28.4±7.5 (r=21-38)
Actividad lúpica	6 pacientes	NA
SDG a la toma	24.8±7.4 (r=14-36)	38.7± (r=38-40)
SDG al nacer	37.2±1.9 (r=32-39)	38.7±0.70 (r=38-40)
Interrupción	2 Partos, 11 Cesáreas	15 Cesáreas
Pérdida Previa	5	1

Tabla 2. Anticardiolipinas y sus isotipos

	Suero Paciente	LA Paciente	Suero Control	LA Control

	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
1	13.2	9.6	8.7	0.9	12.8	11	8	1.3
2	4.4	9.3	11	1.13	12.7	17	5	1
3	4.7	10	8	0.4	14.9	11.2	12.4	0.5
4	11.9	8.2	12	0.7	8.3	6.3	9.4	1
5	7.5	3.9	11	0.4	11.6	4.1	5.6	1.1
6	6.1	9.2	7.8	1.3	12.1	10.2	5.3	1.2
7	8	4.7	3.4	0.4	30.9	5.9	10.7	2.1
8	1	0.7	7.5	0.4	4.4	3.3	6.3	1.3
9	10.3	7.4	40.5	35.1	7.2	4.5	11.9	9.6
10	10.8	3.4	7.2	0.7	8.1	7.3	9.8	1.5
11	10.8	14.1	14.1	0.68	5.8	7	4.1	1
12	1	17.1	17.1	0.5	6.5	7.2	7.1	1.1
13	9.1	13.1	13.1	3.2	5.8	5.1	18.8	0.5

Tabla 3. Anticuerpos anti-β2 glicoproteína 1 (IgG)

	Suero paciente	LA Paciente	Suero Control	LA Control
1	107	79.4	2.1	3.8

2	25.5	20	1.1	2.1
3	7.7	20	1.2	2.6
4	1.4	10.4	1.8	3.7
5	6.6	8	1.1	4.2
6	4.1	11.8	2	2
7	12.5	16.5	1.8	6.3
8	16.7	12	1.5	3.6
9	11.5	11.5	1.3	3.8
10	25.9	7.6	1.5	4.5
11	10.8	5.3	2	4
12	3.4	57.8	2	2.5
13	2	11.5	2.4	13.9

Dos de las pacientes que presentaban estos anticuerpos en LA tenían antecedentes de pérdidas fetales previas. De las 13 pacientes, 8 presentaron un evento obstétrico pretérmino (37 semanas de gestación o menos), aunque todos los productos sobrevivieron. Las figuras 1 y 2 muestran los niveles de anticardiolipinas IgG en suero y líquido amniótico respectivamente, comparándose entre el grupo de pacientes y los controles. Las figuras 3 y 4 comparan los niveles de IgM tanto en suero como en líquido amniótico

respectivamente, entre pacientes y controles. Las figuras 5 y 6 muestran la comparación de los niveles de anti β 2-GP1 en suero y líquido amniótico respectivamente, entre pacientes y controles. En la tabla 3 se resumen las comparaciones entre los pacientes y los controles con respecto a los niveles de aCI y anti β 2-GP1, mostrándose el valor de p que alcanzó cada comparación.

Figura 1. aCI (en unidades GPL) isotipo IgG en suero de pacientes con LES y/o SAAF vs. controles

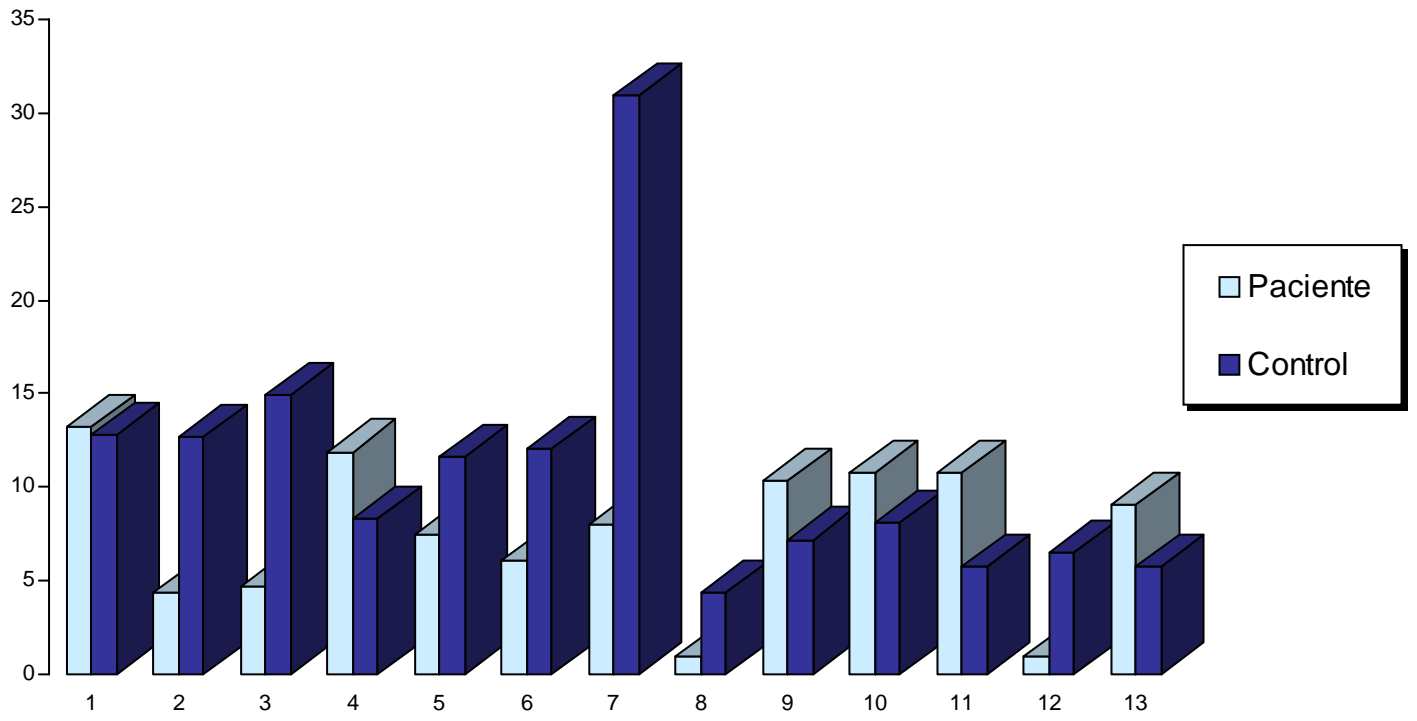


Figura 2. aCI (en unidades MPL) isotipo IgM en suero de pacientes con LES y/o SAAF vs. controles

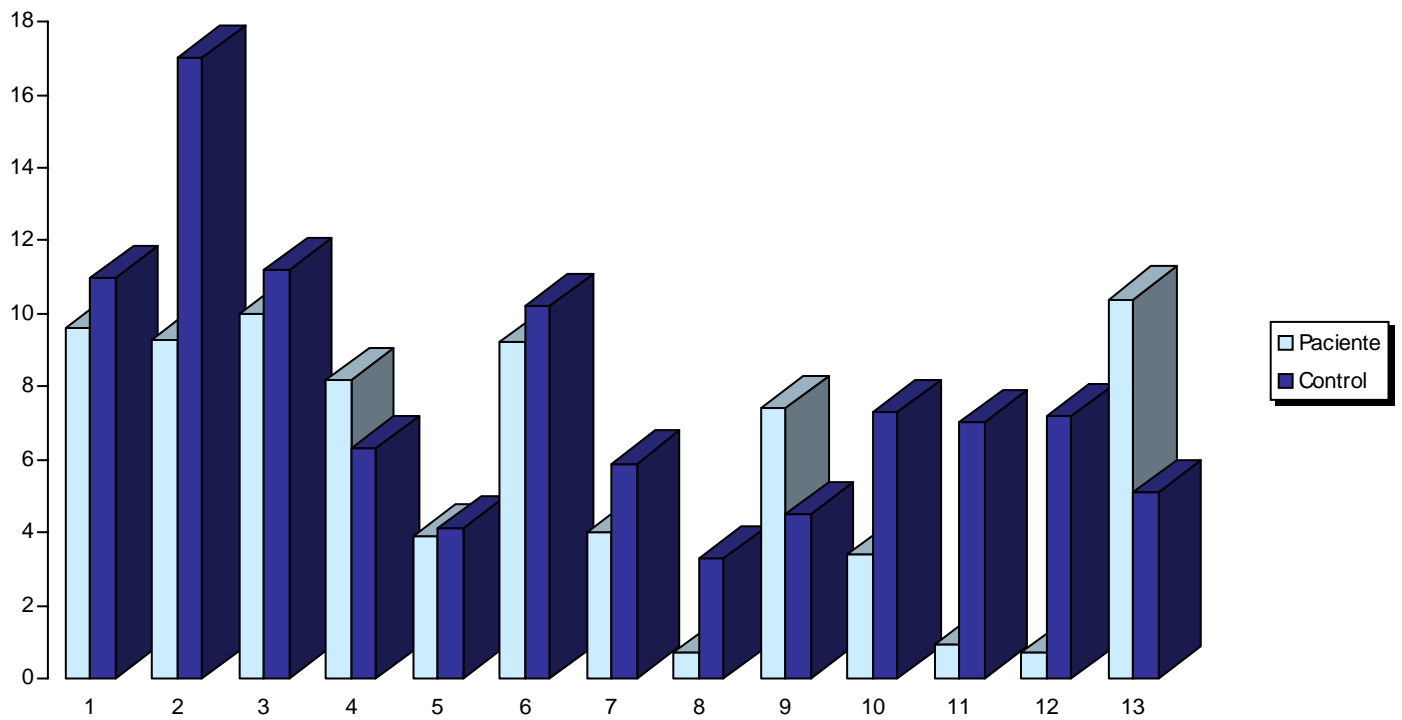


Figura 3. aCI (en unidades GPL) isotipo IgG en líquido amniótico de pacientes con LES y/o SAAF vs. controles

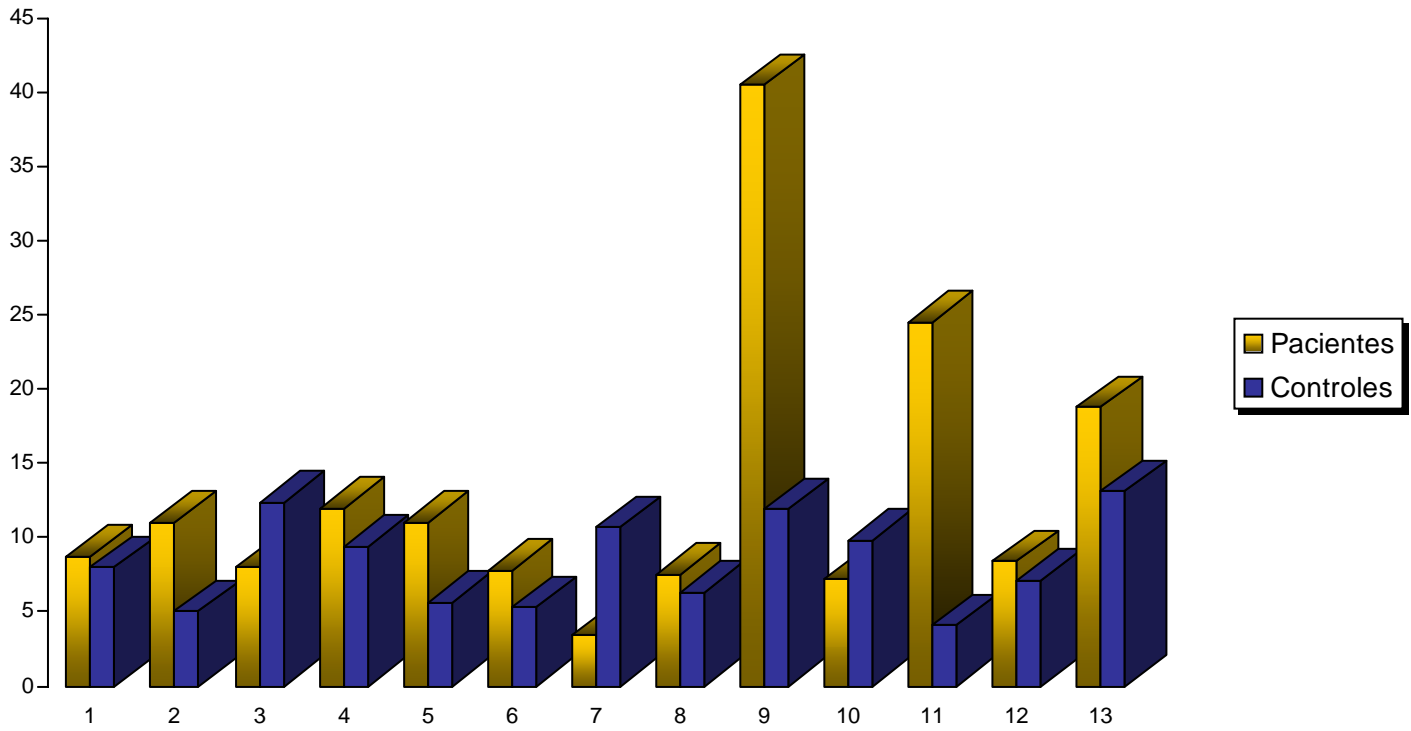


Figura 4. aCI (en unidades MPL) isotipo IgM en líquido amniótico de pacientes con LES y/o SAAF vs. controles

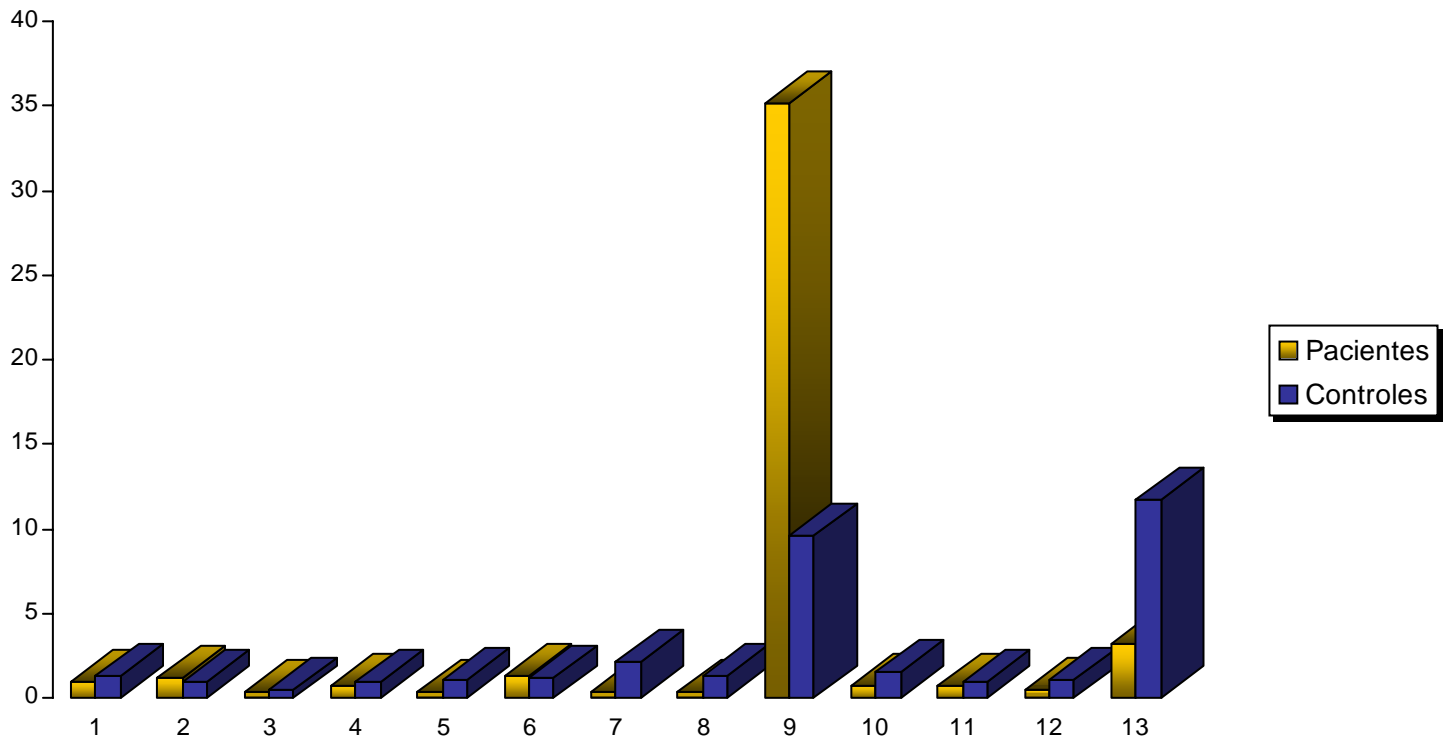


Figura 5. anti β 2-GP1 (en UI) en suero de pacientes con LES y/o SAAF vs. controles

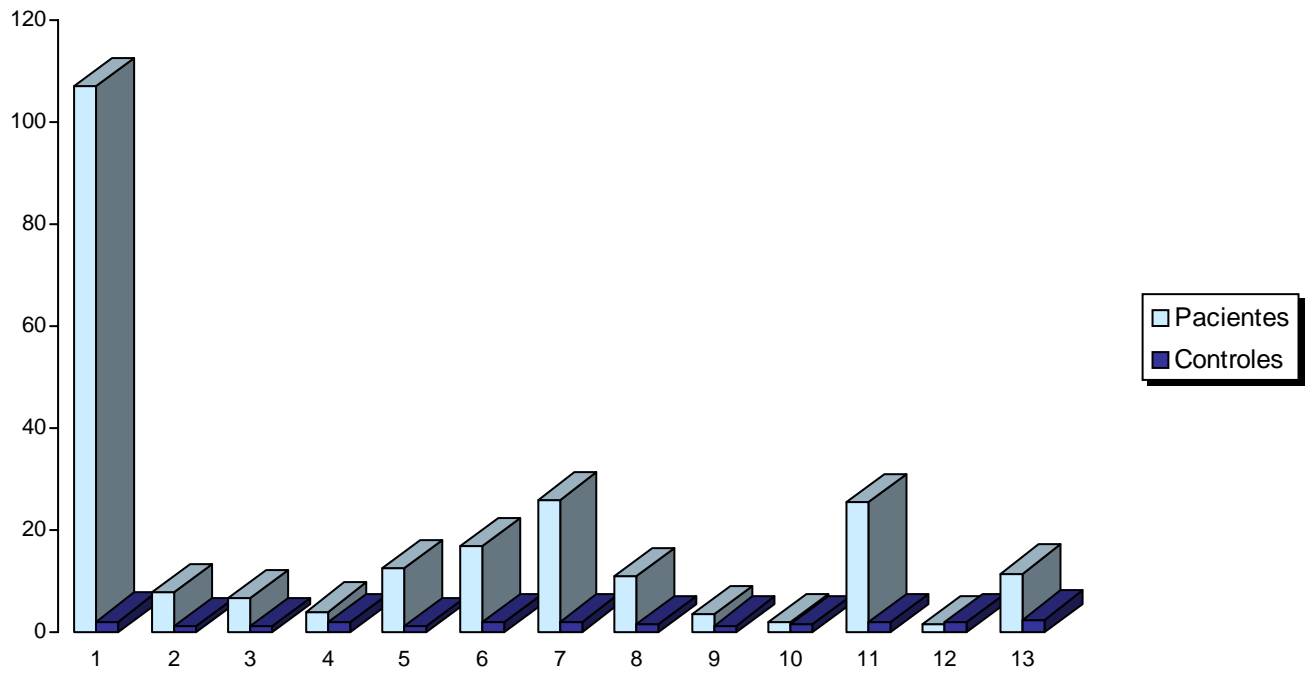


Figura 6. anti β 2-GP1 en líquido amniótico de pacientes con LES y/o SAAF vs. controles

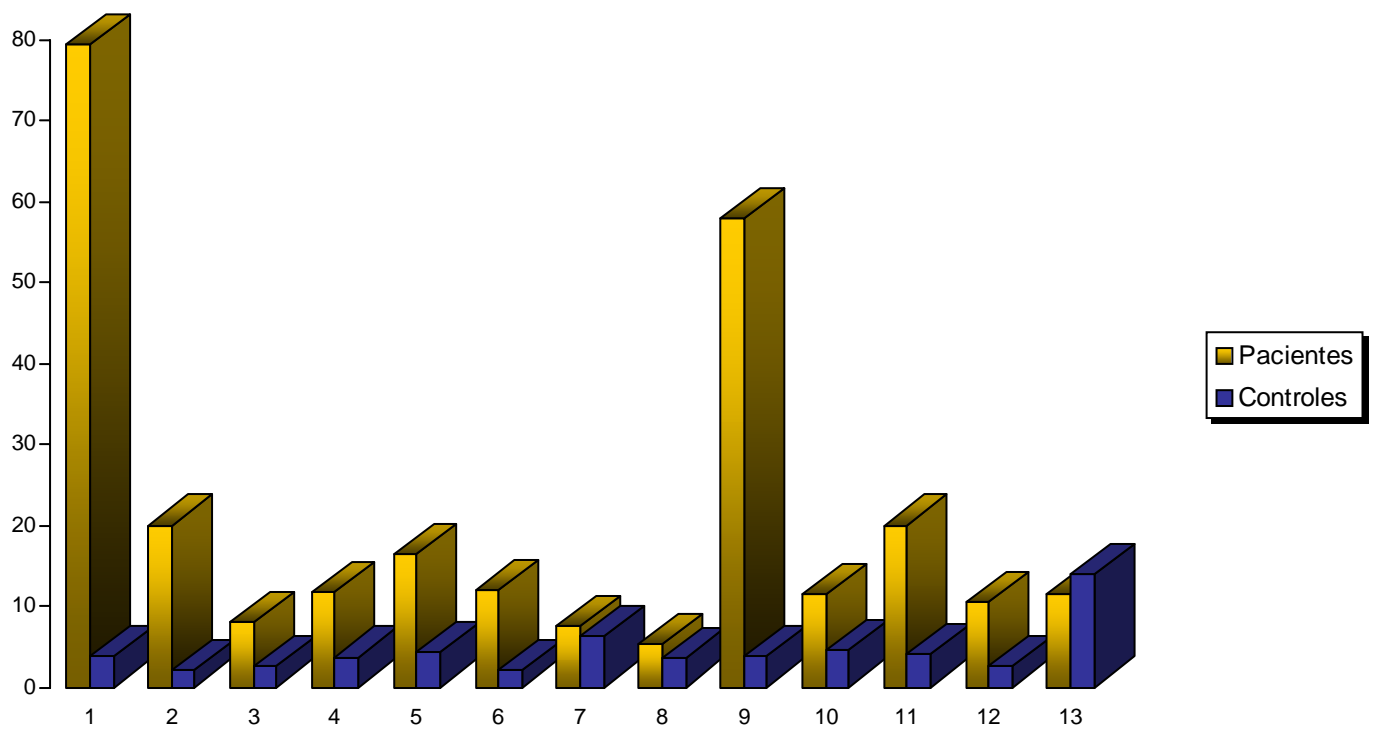


Tabla 3. Comparación entre pacientes y controles

	Pacientes (n=13)	Controles (n=15)	Valor de p
aCl IgG sérico	7.6±3.9	9.5±7.2	0.23

aCl IgM sérico	6.0±3.7	6.7±4.2	0.78
Antiβ2-GP1 sérico	18.0±27.8	1.8±0.5	0.01
aCl IgG LA	12.4±9.1	9.8±5.5	0.48
aCl IgM LA	3.5±9.5	2.3±3.3	0.23
Antiβ2-GP1 LA	20.9±22.0	4.6±2.9	0.005

DISCUSIÓN

Este estudio describe por primera vez la presencia de aCl IgG e IgM y anti β 2-GP1, isotipo IgG en el líquido amniótico de pacientes con LES y/o SAAF. Seis de 13 pacientes (46.1%); 5 con LES y una con SAAF primario tuvieron anticuerpos antifosfolípido en LA. Dos pacientes tuvieron IgG aCl y 4 pacientes tuvieron anti β 2-GP1 (una de ellas tuvo también aCl IgM) en LA. En suero, 4 pacientes (30%) tuvieron anticuerpos antifosfolípido positivos (3 anti β 2-GP1 y 1 aCl IgG). En contraste ningún control tuvo anticuerpos antifosfolípido en LA. En suero solo un control tuvo aCl IgM positivo. La presencia de anti β 2-GP1 en LA de pacientes alcanzó valores estadísticamente significativos al compararlos con controles.

Dos de las pacientes que presentaban estos anticuerpos en LA tenían antecedentes de pérdidas fetales previas, sin embargo en el presente embarazo no hubo complicaciones obstétricas. Estos resultados sugieren que los anticuerpos antifosfolípido, especialmente anti β 2-GP1, isotipo IgG atraviesan la barrera placentaria. Sin embargo la presencia de aCl IgM LA y anti β 2-GP1 en LA con negatividad en el suero sugieren síntesis local de estos anticuerpos^{3,4}. El mecanismo por medio del cual la IgG atraviesa la barrera placentaria es transporte activo por medio de endocitosis, por lo tanto en estas pacientes es posible encontrar aCl maternos en sangre fetal y líquido amniótico⁵. Un solo estudio encontró 54.5 % de positividad para aCl IgG en LA y 27.3% en sangre de cordón umbilical de pacientes con SAAF primario. Sin embargo en este estudio no se determinó la presencia de otros isotipos de inmunoglobulina, o si existía algún otro anticuerpo relacionado con la patogenia de la pérdida fetal asociada a LES y/o SAAF en el microambiente fetal. En el

presente estudio no encontramos una correlación entre los niveles séricos de aCl y su presencia en cantidades significativas en líquido amniótico. El significado de estos hallazgos es desconocido sin embargo es posible que los aCl y anti β 2-GP1 tengan algún papel patogénico en la pérdida fetal, como ya se ha descrito^{3,4}. Una posibilidad es que estos anticuerpos se formen localmente por un estímulo proveniente de los antifosfolípidos del trofoblasto, los denominados amniófosfolípidos⁸. Estos anticuerpos formados localmente pueden interactuar con Anexina V, una proteína placentaria anticoagulante, y producir trombosis.

La presencia de aCl del isotipo IgM en líquido amniótico de mujeres embarazadas con LES y/o SAAF representa una observación no descrita previamente, debida posiblemente a la producción local de aCl (ya que el isotipo IgM no atraviesa la barrera placentaria). El significado clínico de este hallazgo es incierto y se requiere de estudios posteriores para dilucidarlo.

Los anticuerpos anti β 2-GP1 en el líquido amniótico de pacientes con LES y SAAF probablemente también provengan de la circulación materna, al tratarse de IgG. Estos anticuerpos juegan un papel fundamental en la patogenia de la trombosis en SAAF, pero el rol que desempeñen en el microambiente fetal en relación a la morbilidad fetal aún es incierto. Modelos experimentales demuestran que estos anticuerpos se pueden depositar en la placenta, producen retardo en el crecimiento y necrosis placentaria (9) y recientemente se ha demostrado que estos anticuerpos activan complemento en directa asociación a pérdidas fetales⁹.

Las limitaciones de nuestro estudio son las siguientes: la población de pacientes es pequeña y los métodos de detección de anticuerpos

antifosfolípidos en LA no están estandarizados. Sin embargo, nuestros resultados son confiables ya que ningún control compuesto por embarazadas normales presentó positividad para estos anticuerpos en el líquido amniótico. Estos anticuerpos se han identificado en otros fluidos corporales como en líquido cefalorraquídeo¹⁰.

CONCLUSIONES

1. Los aCl y los anti- β 2-GP1 pueden estar presentes en el líquido amniótico de pacientes con o sin historia de pérdida fetal.
2. La presencia de aCl IgM y anti- β 2-GP1 en líquido amniótico puede sugerir transporte transplacentario y/o producción local.
3. Es necesario estandarizar los puntos de corte para niveles de aCl y anti β 2-GP1 en líquido amniótico.

BIBLIOGRAFIA

1. Branch D, Scott J, Kochenour N, Hershgold E, Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant, *New Eng J Med* 1985; 313: 1322-6
2. Love P, Stantoro S, Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and non-SLE disorders, *Ann Int Med* 1990;11:682-88
3. Silver R, MacGregor S, Pasternak J, Neely S, Fetal stroke associated with elevated maternal anticardiolipin antibodies, *Obstet Gynecol* 1992;880:497-99
4. de Klerk O, de Vries T, Sinnige L, An unusual case of neonatal seizures in a new born infant, *Pediatrics* 1997;100:E8
5. Cohen S, Goldenberg M, Rabinovici J, Lidor, A, et al, Anticardiolipin antibodies in fetal blood and amniotic fluid from patients with the antiphospholipid syndrome, *Human Reprod* 1999; 15: 1170-72
6. Botet F, Romera G, Montagut P, et al, Neonatal outcome in women treated for antiphospholipid syndrome during pregnancy, *J Perinat Med* 1997; 23: 192-96
7. Ramos Niembro F. Lupus eritematoso generalizado, y síndrome antifosfolípido. En: *Enfermedades Reumáticas: clasificación y diagnóstico*, 1ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana México 1999
8. Cowchock F, Reece E, Balaban D, Branco D, et al, Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone to low-dose heparin treatment, *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1318-23

9. Holers V, Girardi G, Mo L, et al, Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody induced fetal loss, J Exp Med 2002; 195: 211-220
10. Lai N, Lan J, Evaluation of cerebrospinal anticardiolipin antibodies in lupus patients with neuropsychiatric manifestations, Lupus 2000; 9: 353-7