

BAJA PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDOS AUTOINMUNES EN ENFERMEDADES HEPATICAS

GABRIELA F. de LARRAÑAGA¹, NIGEL HARRIS E.³, SILVIA S. PIERANGELI³, BEATRIZ S. ALONSO¹, TERESA SCHRODER², HUGO FAINBOIM²

¹ Sección Bioquímica, área Hemostasia y Trombosis; ² Unidad N° 4 Hepatopatías Infecciosas, Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz, Buenos Aires; ³ Morehouse School of Medicine, Atlanta, USA

Resumen Los anticuerpos antifosfolípidos (aPL) se han descrito en numerosas enfermedades. Ellos son definidos como una gran familia de inmunoglobulinas (Ig) alloinmunes o autoinmunes. Los anticuerpos de tipo autoinmune se relacionan con clínica de eventos trombóticos arteriales y/o venosos, trombocitopenia y/o pérdidas fetales recurrentes, y se encuentran en pacientes con síndrome antifosfolípido o en lupus eritematoso sistémico. Estos anticuerpos están dirigidos principalmente contra proteínas o complejos proteína-fosfolípido. En cambio los alloanticuerpos se relacionan con enfermedades infecciosas, generalmente desaparecen con la remisión de la enfermedad y están dirigidos contra fosfolípidos únicamente (particularmente cardiolipina). El tipo y papel de los aPL encontrados en enfermedades infecciosas aún sigue siendo materia de debate. El objetivo de este estudio fue investigar la prevalencia de aPL de tipo autoinmune (IgG e IgM) en enfermedades hepáticas de diferentes etiologías. Se estudió una población de 128 pacientes portadores crónicos del virus B, del virus C y con enfermedades autoinmunes del hígado, sin tratamiento alguno; y una población de 40 controles sanos que obtuvimos de banco de sangre. Se utilizó un test de ELISA para aPL que usa como antígeno una mezcla de fosfolípidos en lugar de cardiolipina, capaz de detectar con mayor especificidad y sensibilidad los anticuerpos de tipo autoinmune. Los resultados muestran que no es significativa la presencia de los aPL de tipo autoinmune en pacientes con enfermedad hepática viral (2%) o autoinmune del hígado (3%), (grupo control: 0%).

Abstract *Low prevalence of autoimmune antiphospholipid antibodies in hepatic diseases.* Antiphospholipid antibodies (aPL) have been associated with different diseases. They are defined as a large family of immunoglobulins (Ig) of either alloantibodies or autoantibodies. The autoimmune antibodies are associated with venous and/or arterial thrombosis, thrombocytopenia and recurrent fetal loss in the so-called antiphospholipid syndrome or in systemic lupus erythematosus. These antibodies are directed against proteins or phospholipid-protein complexes. On the contrary, antiphospholipid antibodies (alloantibodies) which are found in infectious diseases sera (syphilis, HIV, and other viral diseases), disappear with illness remission and are directed to phospholipids alone (particularly cardiolipin) and are not associated with thrombosis or recurrent fetal loss. However, the role and type of aPL found during hepatic diseases is still unclear. To investigate the prevalence of autoimmune aPL (IgG and IgM) during different hepatic diseases, we have studied 128 patients with hepatitis C virus, hepatitis B virus and hepatic autoimmune diseases without treatment as well as 40 healthy control subjects. We have used a specific ELISA kit, that uses a mixture of phospholipid instead of cardiolipin alone, and allows a better detection of aPL of the autoimmune type. Our results show that autoimmune aPL are not significantly increased in viral hepatic diseases (2%) or autoimmune diseases of the liver (3%) when compared to the control group (0%).

Key words: antiphospholipid antibodies, anticardiolipin antibodies, hepatitis C, autoimmune hepatitis, hepatitis B

Los anticuerpos antifosfolípidos (aPL) son una familia de inmunoglobulinas (Ig) heterogéneas, de los cuales los más estudiados son: anticoagulante lúpico (LA), que se distingue por prolongar pruebas de coagulación fosfolípido dependientes¹; y los anticuerpos anticardiolipina (aCL) detectados por ELISA². Numerosos tra-

bajos han demostrado la relación existente entre la presencia de LA y/o aCL y eventos trombóticos arteriales y/o venosos, trombocitopenia y/o pérdidas fetales recurrentes en el llamado síndrome antifosfolípido (SAP) y en lupus eritematoso sistémico (LES)^{3,4}. Los aCL también podemos encontrarlos en patologías de origen infeccioso, tanto en infecciones agudas como sífilis⁵, tuberculosis⁶, citomegalovirus⁷ o en infecciones crónicas como síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA)⁸, hepatitis C (HCV)⁹, etc. Sin embargo en los casos de infecciones, ya sea por bacterias, virus o parásitos, no está claro el rol patogénico de estos anticuerpos.

Recibido: 13-IX-1999

Aceptado: 21-VII-2000

Dirección postal: Dra. Gabriela de Larrañaga, Sección Bioquímica-Hemostasia y Trombosis, Hospital de Enfermedades Infecciosas F.J. Muñiz, Uspallata 2272, 1282 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-0237) 4630894 e-mail: gabyl@infovia.com.ar

A partir de 1990 con el descubrimiento de los cofactores proteicos para aPL (β_2 glicoproteína I y/o protrombina) estos anticuerpos pueden ser clasificados en autoinmunes o alloinmunes según requieran de la presencia o no de estos cofactores proteicos¹⁰. Los aPL que están dirigidos contra un complejo fosfolípido-proteína o proteína son los denominados autoanticuerpos y están más fuertemente relacionados con eventos trombóticos^{11, 12}, mientras que los dirigidos contra fosfolípidos únicamente, son los alloanticuerpos, generalmente epifenómenos de una enfermedad infecciosa aguda como sífilis¹³.

Tradicionalmente los aCL detectados en los sistemas ELISA utilizan como antígeno cardiolipina. Este ensayo detecta aCL presentes en diferentes enfermedades infecciosas como sífilis (alloinmunes), así como los encontrados en SAP o LES (autoinmunes)². Sin embargo en el caso de sífilis u otras infecciosas los aCL no están asociados con trombosis, pérdidas fetales y/o LA¹⁴. Recientemente se ha sugerido que usando una mezcla de fosfolípidos y β_2 Glicoproteína I (β_2 GPI) en vez de cardiolipina como antígeno en los ensayos de ELISA es posible identificar con mayor especificidad y sensibilidad los aPL de tipo autoinmune¹⁵⁻¹⁷.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la prevalencia de aPL de tipo autoinmune en enfermedades hepáticas de diferentes etiologías. Asimismo determinar si el virus de la hepatitis C es capaz de desarrollar aPL de tipo autoinmune para poder así agregarlos a la larga lista de autoanticuerpos desarrollados por este virus.

Materiales y métodos

Pacientes

Fueron estudiados 128 pacientes con enfermedades hepáticas de diferentes etiologías (Tabla 1), 98 de estos pacientes tenían enfermedad hepática viral crónica de los cuales 76 eran HCV+ y 22 portadores del virus B (HBV) y los otros 30 pacientes tenían hepatopatías autoinmunes distribuidos de la siguiente manera: 22 hepatitis autoinmunes de tipo I (HAI) y ocho cirrosis biliar primaria (CBP). Se utilizaron como controles 40 dadores de banco de sangre.

TABLA 1.— Cantidad de pacientes estudiados en función del tipo de enfermedad hepática

Enfermedad del hígado	Cantidad de pacientes
Portación viral crónica	98
- Hepatitis por Virus C	76
- Hepatitis por Virus B	22
Enfermedad autoinmune del hígado	30
- Hepatitis autoinmune de tipo I	22
- Cirrosis biliar primaria	8
Grupo control	40

En todos los casos se extrajo sangre venosa en un tubo sin anticoagulante. El suero se separó y congeló a -20 °C hasta el momento de las determinaciones.

Métodos

La portación de HCV fue demostrada por técnicas de PCR (RNA-HCV), HBV por la presencia del antígeno de superficie (HbsAg: ELISA) y HAI fue definida por la presencia de anticuerpos antimúsculo liso tipo actina y/o anticuerpos antinúcleo en títulos mayores a 1/80. Se excluyeron aquellos pacientes con coinfección o presencia de infección por el virus HIV, como así también aquellos pacientes que estuvieron o estaban bajo tratamiento alguno al momento del estudio.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento del comité de ética del Hospital.

Todos los pacientes se evaluaron clínicamente para registrar eventos trombóticos durante un período no menor de 6 meses.

Los aPL de tipo IgG e IgM fueron detectados usando APhL[®] ELISA Kit (Doraville, GA, USA). Este ensayo utiliza 6 puntos en la curva de calibración y una mezcla de fosfolípidos en vez de cardiolipina como antígeno.

El estudio estadístico se realizó mediante la prueba chi-cuadrado. Se consideró significativo un $p < 0.05$.

Resultados

Los sueros de los 128 pacientes con enfermedades hepáticas de diferentes etiologías fueron estudiados por aPL de tipo autoinmune con APhL[®] ELISA Kit como así también el grupo control.

Se encontró una prevalencia de 2% en pacientes con portación viral crónica (3% en HCV+ y 0% en HBV+), de 3% en pacientes con enfermedad autoinmune hepática y de 0% en el grupo control (Tabla 2).

Ambos resultados no son estadísticamente diferentes comparados con el grupo control ($p > 0.05$).

No se registraron eventos trombóticos o abortos espontáneos en ninguno de los pacientes.

TABLA 2.— Prevalencia de anticuerpos antifosfolípidos en pacientes con portación crónica del virus B y del virus C, en hepatitis autoinmune de tipo I, en cirrosis biliar primaria y en un grupo control: razón entre resultados positivos y número total de pacientes para cada grupo (%)

Enfermedad del hígado	Anticuerpos antifosfolípidos razón %
Portación viral crónica	2/98 2*
- Hepatitis por Virus C	2/76 3
- Hepatitis por Virus B	0/22 0
Hepatitis autoinmune	1/30 3*
- Hepatitis autoinmune de tipo I	1/22 4
- Cirrosis biliar primaria	0/8 0
Grupo control	0/40 0*

* $p > 0.05$

Discusión

Los aPL se encuentran asociados a numerosas enfermedades, autoinmunes e infecciosas¹³. Se han estudiado en enfermedades infecciosas agudas y crónicas, tanto virales, bacterianas como parasitarias⁵⁻⁹. La patogénesis y el significado clínico de los aPL en estos últimos casos aún son inciertos. Se han descrito en enfermedades infecciosas como SIDA, en enfermedades pulmonares, en enfermedades hepáticas, etc., pero aquí el hallazgo de aPL no se asocia claramente con eventos trombóticos, trombocitopenias y/o pérdidas fetales recurrentes^{18, 19}, contrariamente a lo demostrado para SAP o LES¹². Muchos autores han podido estudiar las diferencias existentes entre los aPL encontrados en determinadas enfermedades infecciosas como sífilis y los anticuerpos encontrados en SAP o en LES^{14, 20}. Se estudiaron las diferencias en los antígenos involucrados, en la prevalencia en las cadenas pesadas, en los niveles medios de positividad o en los requerimientos en los cofactores proteicos^{21, 22}. Esto permitió clasificar a los aPL en aPL de tipo alloinmune o en aPL de tipo autoinmune. Los aPL alloinmunes, dirigidos contra fosfolípidos, se encuentran generalmente en diferentes enfermedades infecciosas mientras que los aPL autoinmunes, dirigidos contra complejos fosfolípidos-proteínas o proteínas, están fuertemente relacionados con clínica del llamado SAP o en LES.

Al tratar de investigar la relación existente entre aPL e infecciones, es muy importante tener en cuenta si la infección es aguda o crónica, ya sea viral, bacteriana o parasitaria.

El caso más estudiado de infección aguda y hallazgo de aPL ha sido la sífilis, en la cual no quedan dudas que estos anticuerpos hallados son epifenómenos de la infección, desaparecen con la remisión de la enfermedad y no requieren de ningún cofactor proteico¹⁴.

En cambio en las infecciones crónicas o en las infecciones crónicas en individuos genéticamente predispuestos como pueden inducir fenómenos de autoinmunidad²³, los aPL encontrados requieren de un cuidadoso análisis, tanto de la metodología empleada, de la persistencia a través del tiempo, de los niveles de positividad y del contexto clínico de los pacientes. En los últimos años se está trabajando en la producción de aPL autoinmunes mediante inmunización a ratones con péptidos virales y bacterianos por lo que se afirma el concepto que no todos los aPL encontrados en enfermedades infecciosas son epifenómenos.

Una mala interpretación en el hallazgo de aPL durante procesos infecciosos puede traer como consecuencia una inadecuada implementación de tratamiento. En el caso de SAP primario o secundario, la terapéutica puede hacerse con anticoagulación, con drogas inmunosupresoras o con inmunoglobulinas.

La portación crónica del virus de la hepatitis B y especialmente del virus C se ha asociado con hallazgos de fenómenos o de enfermedad autoinmune. Es bien conocido que las enfermedades autoinmunes aquí estudiadas (HAI y CBP) se asocian fuertemente con la presencia de autoanticuerpos y/o enfermedad autoinmune extrahepática²⁴.

De este estudio podemos concluir que tanto las enfermedades virales crónicas del hígado o enfermedades autoinmunes hepáticas no se asocian con la presencia de aPL autoinmunes o con eventos trombóticos.

Siendo el HCV capaz de desarrollar autoanticuerpos, de acuerdo a los resultados obtenidos, consideramos que los aPL autoinmunes no pueden ser incluidos entre ellos.

Los LA son parte de la familia de aPL. En este estudio no se han determinado, ya que la gran discrepancia en las publicaciones se da en los hallazgos en los aCL^{9, 25, 26}. Algunos autores encontraron una prevalencia significativa de aCL en pacientes HCV⁺ y en otras infecciones^{27, 28}, pero analizando la metodología empleada, la detección de aCL se realizó mediante un ELISA clásico (cardiolipina como antígeno), por lo tanto los datos obtenidos reflejan la prevalencia de aCL allo y autoinmunes, sin poder diferenciarlos. En nuestro estudio utilizamos un sistema ELISA cuyo antígeno es una mezcla de fosfolípidos de carga negativa (en lugar de cardiolipina) y eso hace que sea más específico para la detección de aPL de tipo autoinmune; y, por lo tanto, podemos concluir que los aPL autoinmunes no están presentes en enfermedades virales crónicas o autoinmunes del hígado y que no se justifica el requerimiento de la búsqueda de los mismos. Queda por aclarar el significado de los aPL en estos pacientes cuando existe evento trombótico arterial y/o venoso.

Bibliografía

1. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: An Update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
2. Harris EN, Pierangeli SS, Birch D. Anticardiolipin Wet Workshop Report. Fifth International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 616-24.
3. Horbach DA, Oort EV, Donders RCJM, Derksen RHWM, Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1996; 76: 916-24.
4. Harris EN. The antiphospholipid syndrome - an introduction. In: Phospholipid Antibodies. Harris EN, et al. (eds) Boca Raton: CRC Press 1991; 373-86.
5. Meyer O, Cyna L, Bourgeois P, Kahn MF, Ryckewaert A. Profile and cross-reactivities of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and syphilis. *Clin Rheumatol* 1987; 6: 369-77.

6. Santiago MB, Cossmelli W, Tuma MF, Oliveira RM. Anticardiolipin antibodies in infectious diseases. *Clin Rheumatol* 1989; 8: 23-8.
7. Labarca JA, Rabagliatti RM, Radrigan FJ, et al. Antiphospholipid syndrome associated with cytomegalovirus infection: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 197-200.
8. Montagud M, Muñoz Díaz E, Fontcuberta J. Anticoagulante lúpico y anticuerpos anticardiolipina en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Biol Clin Hematol* 1991; 13: 57-62.
9. Al Saeed A, Makris M, Malia RG, Preston FE, Greaves M. The development of antiphospholipid antibodies in haemophilia is linked to infection with hepatitis C. *Br J Haemat* 1994; 88: 854-8.
10. Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) direct not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-7.
11. Roubey RA, Eisenberg RA, Harper MF, Winfield JB. Anticardiolipin autoantibodies recognize β_2 -Glycoprotein I in the absence of phospholipid. *J Immunology* 1995; 154: 954-60.
12. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcon-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- β_2 -Glycoprotein I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995; 22: 1899-906.
13. Roubey RAS. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulants and other antiphospholipid autoantibodies. *Blood* 1994; 84: 2854-67.
14. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Kordich LC, Carreras LO. Reactivity to β_2 -Glycoprotein I clearly differentiates anticardiolipin antibodies from antiphospholipid syndrome and syphilis. *Thromb Haemost* 1996; 75: 717-20.
15. Pierangeli SS, Stewart M, Silva LK, Harris EN. An antiphospholipid wet workshop: 7th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol* 1998; 25: 156-60.
16. Harris EN, Pierangeli SS. A more specific ELISA assay for the detection of antiphospholipid antibodies. *Clin Immunol Newsletter* 1995; 15: 26-8.
17. Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, Harris EN, Polisson RP. Comparison between the standart anticardiolipin antibody test and a new phospholipid test in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1999; 26: 591-6.
18. Toulon P, Gris JC, Salomon D, et al. Antiphospholipid antibodies in HIV-infected patients are not associated with a prothrombotic state. *Nouv Rev Hematol* 1995; 37: s97 s101.
19. Gotch M, Matsuda J. Human immunodeficiency virus rather than Hepatitis C virus infection is relevant to the development of an anti-cardiolipin antibody. *Am J Hematol* 1995; 50: 220-2.
20. Levy RA, Azzudin F, Gharavi Sammaritano LR, et al.: Characteristics of IgG antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and syphilis. *J Rheumatol* 1990; 17: 1036-41.
21. Arvieux J, Darnige L, Hachulla E, Rousset B, Bensa JC, Colomb MG. Species specificity of anti- β_2 -Glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibodies quantitation. *Thromb Haemost* 1996, 75: 725-30.
22. Arvieux J, Rousset B, Ponard D, Colomb MG. IgG₂ subclass restriction of anti- β_2 -Glycoprotein I antibodies in autoimmune patients. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 310-5.
23. Sekigawa I, Kaneko H, Hishikawa T, et al. HIV infection and SLE: Their pathogenic relationship. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 175-80.
24. Hadziyannis S. Nonhepatic manifestations and combined diseases in HCV infection. *Digest Dis Sciences* 1996; 41: 635-745.
25. Chedid A, Chadalawada KR, Morgan TR, et al. Phospholipid antibodies in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1994; 1465-71.
26. Makris M, Preston FE, Triger DR, Underwood JCE. Hepatitis C antibodies and chronic liver disease in haemophilia. *Lancet* 1990; 335: 1117-9.
27. Matsuda J, Saitoh N, Gotch M, et al. High prevalence of anti-phospholipid antibodies and anti-thyroglobulin antibodies in patients with Hepatitis C virus infection treated with Interferon α . *Am J Gastroenterology* 1995; 90: 1138-41.
28. Prieto J, Yuste JR, Beloqui O, et al. Anticardiolipin antibodies in chronic Hepatitis C: Implication of Hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology* 1996; 23: 199-204.

Science is facts. Just as houses are made of stone, so is science made of facts. But a pile of stones is not a house and a collection of facts is not necessarily science.

La ciencia es hechos. De la misma manera que las casas están hechas de piedras, así la ciencia está hecha de hechos. Pero una pila de piedras no es una casa y una colección de hechos no es necesariamente ciencia.

Henri Poincaré (1854-1912)

Value of science, 1904