

Anticuerpos antifosfolipidos y anticuerpos antinucleares en pacientes con pérdidas de embarazo y pacientes con infertilidad primaria

María M. Ramírez-Alvarado.^{1,3}, Norma Oñate de González ², Carmen González-Amaro ³, Carlos Gonzalez-Cintra ², Antonio Sanoja-Breña ³.

¹Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Bioanálisis.

²Centro Valenciano de Fertilidad y Esterilidad, Cevalfes. Instituto Docente de Urología. Cons. 218. Av. Carabobo. Urb. La Viña. Valencia 2001. Edo. Carabobo. Venezuela.

³Laboratorio Clínico César Sánchez Font. Centro Médico Dr. Rafael Guerra Méndez. Calle Rondón c/c 5 de Julio. Valencia 2001. Edo. Carabobo. Venezuela.

Correspondencia: María Matilde Ramírez Alvarado

Departamento de Bioquímica

Escuela de Medicina

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad de Carabobo

Valencia 2001. Edo. Carabobo. Venezuela.

e-mail: matilderamirez@hotmail.com

Teléfono: +58-241-8236055

Cel: +58-414-4307392

Fax: +58-241- 8561200

RESUMEN

Anticuerpos antifosfolipidos y anticuerpos antinucleares en pacientes con pérdidas de embarazo y pacientes con infertilidad primaria

Los anticuerpos antifosfolípidos (APL) y anticuerpos antinucleares (ANA) han sido asociados con aborto espontáneo recurrente (RSA) y con infertilidad primaria. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y anticuerpos antinucleares en pacientes venezolanas con infertilidad primaria o con pérdida de uno o más embarazos. Se investigó la presencia de APL (IgM e IgG) y ANA en un total de 47 pacientes con infertilidad primaria y 66 pacientes con aborto espontáneo. En pacientes con infertilidad primaria la incidencia de APL y ANA fue 12,8% (P=0,019) y 25,5% (P=0,003) respectivamente. En el grupo de pacientes con historia de pérdida de embarazos, 12,1% (P=0,022) fue positivo para APL y 21,2% (P=0,007) para ANA. Los controles fueron 40 pacientes saludables con fertilidad probada y sin historia de pérdida de embarazos o enfermedad autoinmune. En el grupo control la incidencia de APL fue 0,0% y 2,5% para ANA. Conclusiones: mujeres venezolanas con infertilidad primaria y mujeres con RSA presentan una mayor incidencia de APL y ANA comparadas con el grupo control. La alta incidencia de autoanticuerpos encontrada en estas pacientes puede sugerir una implicación directa de estos autoanticuerpos en el fallo reproductivo. Finalmente se concluye que pacientes con fallo reproductivo deben ser

inmunológicamente evaluadas y tratadas antes de ser sometidas a técnicas de fertilización asistida o antes de un nuevo embarazo en aquellos casos de aborto espontáneo.

Palabras clave: anticuerpos antinucleares, anticuerpos antifosfolípidos, aborto espontáneo, infertilidad primaria.

ABSTRACT

Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with pregnancy losses and patients with primary infertility

Antiphospholipid antibodies (APL) and antinuclear antibodies (ANA) have been reported to be associated with recurrent spontaneous abortion (RSA) and with primary infertility. The objective of this study was to determine the autoimmune profile of Venezuelan female patients with primary infertility and a history of spontaneous abortions. A total of 47 patients with primary infertility and 66 patients with a history of pregnancy loss were investigated for IgM and IgG APL and ANA. In patients with primary infertility the incidence of APL and ANA was 12.8% ($P= 0.019$) and 25.5% ($P= 0.003$) respectively. In the group of patients with a history of miscarriage, 12.1% ($P= 0.022$) were positive for APL and 21.2% ($P= 0.007$) for ANA. Controls were 40 healthy patients with proven fertility and no history of pregnancy loss or autoimmune disease. In the control group the incidence of APL was 0.0% and 2.5% for ANA. Conclusions: Venezuelan women with primary infertility and women who have had spontaneous abortions have a higher incidence of APL and ANA when compared with normal controls. The high incidence of autoantibodies found in these patients might suggest a direct involvement of such antibodies in reproductive failure.

Key words: antinuclear antibodies, antiphospholipids antibodies, spontaneous abortion, primary infertility.

INTRODUCCIÓN

Los fosfolípidos están implicados en la conversión del citotrofoblasto en sincitiotrofoblasto durante la formación de la placenta en el embarazo (1-3). Los anticuerpos antifosfolípidos (APL) presentes en la madre están asociados con retardo y daño en el desarrollo de la placenta, retardo del crecimiento intrauterino, aborto espontáneo recurrente (RSA), endometriosis, infertilidad, fallas de la fertilización *in vitro* y fallas en la implantación del embrión (3-5). Los anticuerpos antifosfolípidos alteran el desarrollo de la placenta y el feto al inducir eventos trombóticos en la placenta (4,6). Adicionalmente, estudios realizados en madres con RSA han demostrado que el riesgo de presentar un aborto espontáneo aumenta en proporción al número de abortos previos, probablemente debido a un aumento en la incidencia de los APL inducidos en cada aborto (7,8).

Los modelos animales apoyan el rol de los autoanticuerpos en los fallos reproductivos (9-11). Un modelo murino sugiere que los APL activan complemento localmente en la placenta, generando productos que median el daño a la placenta y pueden llevar al retardo en el crecimiento y a la pérdida

fetal (10). La activación del complemento por los APL en modelos animales sugiere que la causa del daño a los tejidos en el aborto espontáneo recurrente es probablemente multifactorial.

Los anticuerpos antinucleares (ANA) se han asociado con RSA (7,12-14). El suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico/síndrome antifosfolípido reduce el crecimiento y proliferación de los trofoblastos placentarios y aumenta su tasa de apoptosis en cultivo celular (9). Por otro lado, otros reportes contradictorios indican una pobre asociación entre ANA y RSA (7,12,15).

El objetivo de este estudio fue evaluar la prevalencia de autoanticuerpos de las clases IgM e IgG contra fosfolípidos y contra antígenos nucleares en pacientes con infertilidad primaria, en pacientes con aborto espontáneo y el grupo control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes: El grupo en estudio estuvo conformado por un total de 47 pacientes con infertilidad primaria y 66 pacientes con historia de aborto espontáneo que acudieron a consulta al Centro Valenciano de Fertilidad y Esterilidad - CEVALFES-, Instituto Docente de Urología (Valencia, Venezuela) durante el período enero 2002-diciembre 2003. En el grupo con historia de pérdida de embarazos estuvo conformado por 31 pacientes con un aborto espontáneo previo y 35 pacientes con dos abortos espontáneos previos de etiología desconocida. Ninguna mantuvo su embarazo más allá de las 24 semanas de gestación. Ninguna paciente tenía historia enfermedad autoinmune y ninguna tenía abortos inducidos. Las causas genéticas, anatómicas, endocrinas e infecciosas para sus abortos espontáneos fueron excluidas en una cuidadosa evaluación clínica. Las mujeres que se encontraron embarazadas al inicio del trabajo fueron excluidas. Las pacientes con infertilidad primaria conformaron un grupo de 47 pacientes que nunca han logrado un embarazo y ninguna tenía historia de enfermedad autoinmune. El grupo con infertilidad primaria está conformado por pacientes que nunca han logrado un embarazo. Las pacientes con infertilidad primaria fueron evaluadas para excluir causas estructurales, endocrinas o infecciosas como causas de su infertilidad. Los sujetos de el grupo control fueron reclutados en el Laboratorio Clínico César Sánchez Font, Clínica Dr. Rafael Guerra Méndez (Valencia, Venezuela) y se les realizó una evaluación médica y una historia clínica completa. El grupo control estuvo conformado por 40 mujeres no embarazadas que han tenido dos embarazos y partos sin complicaciones y sin historia de abortos (incluyendo inducidos o espontáneos), enfermedad autoinmune, enfermedad reumática, enfermedad tromboembólica o infección reciente.

Determinación de anticuerpos antifosfolípidos: Se determinaron los anticuerpos antifosfolípidos de las clases IgG e IgM por medio de un ensayo inmunoenzimático específico cuantitativo (ELISA indirecto) de acuerdo a las instrucciones del kit comercial (Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM, Org 529, Orgentec Diagnostika, Mainz, Alemania). Las microplacas estaban recubiertas con una mezcla de los siguientes fosfolípidos: cardiolipina, fosfatidilserina,

fosfatidilinositol y ácido fosfatídico. Además, las microplacas estaban saturadas con β 2-glicoproteína I humana. Para la determinación cuantitativa de APL se utilizaron calibradores y controles (positivo y negativo). Calibradores, controles y muestras se corrieron por duplicado. Las muestras a analizar se incubaron con las microplacas recubiertas con una mezcla de fosfolípidos. Si los anticuerpos antifosfolípidos estaban presentes en el suero se unieron a los fosfolípidos inmovilizados en la placa. Luego de varios lavados se incubó la placa con el anticuerpo de caballo anti-IgG humana o anti-IgM humana marcado con la enzima peroxidasa, seguidamente se lavó la placa y se añadió el sustrato enzimático. La hidrólisis del sustrato cromogénico por la peroxidasa produjo un cambio de color el cual fue medido en el espectrofotómetro. La densidad óptica de cada pozo se determinó usando un lector para microplacas SLT Spectra I a 450 nm con lectura bicromática con filtro de referencia a 600-690 nm. Para la determinación cuantitativa de APL se utilizaron calibradores que contenían anticuerpos antifosfolípidos de la clase IgG o de la clase IgM (0; 6,3; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 GPL U/mL o MPL U/mL respectivamente). Las concentraciones de las muestras se determinaron a partir de la curva de calibración. Una concentración igual o mayor a 10 GPL U/ml o 10 MPL U/mL fue considerada positiva.

Anticuerpos antinucleares [Se determinó la presencia de anticuerpos antinucleares de la clase IgG en suero por medio de un ensayo inmunoenzimático específico (ELISA indirecto). Se utilizó el Ana Screen ELISA Test System (Zeus Scientific, Inc., NJ, U.S.A.) de acuerdo a las instrucciones del kit comercial. Para la determinación de ANA se utilizó un calibrador y controles (positivo y negativo). Calibrador, controles y muestras se corrieron por duplicado. Las muestras a analizar se incubaron con las microplacas recubiertas con una mezcla de antígenos nucleares (dsDNA, Sm, Sm/RNP, SSA, SSB, Scl-70 y Jo-1). Si los anticuerpos antinucleares estaban presentes en el suero se unieron a los antígenos inmovilizados en la placa. Luego de varios lavados, se incubó la placa con el anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con la enzima peroxidasa, seguidamente se lavó la placa y se añadió el sustrato enzimático. La hidrólisis del sustrato cromogénico por la peroxidasa produjo un cambio de color el cual fue medido en el espectrofotómetro. La densidad óptica de cada pozo se determinó usando un lector para microplacas SLT Spectra I a 450 nm. El punto de corte para las muestras positivas se calculó según las instrucciones del kit comercial.

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistix versión 6.0. La incidencia de APL así como la incidencia de ANA en los grupos estudio y el grupo control fue analizada por Chi-cuadrado. El número de abortos previos y el aumento en la incidencia de APL se relacionó por el Test de Proporción de dos muestras independientes. Para el análisis de la edad y número de embarazos en los grupos estudio y control se usó la media y la desviación estándar.

RESULTADOS

La edad y el número de embarazos de los grupo estudio y del grupo control se muestran en la Tabla 1. La distribución de la edad fue muy parecida entre los grupos estudio y el grupo control. El diferencia del número de embarazos no fue significativa entre el grupo de pacientes

con aborto espontáneo y el grupo control. El grupo con infertilidad primaria está conformado por pacientes que nunca han logrado un embarazo.

Tabla 1. Edad y número de embarazos en pacientes con infertilidad primaria, pacientes con aborto espontáneo y grupo control

GRUPO	n	Edad (años) media \pm DS	N° de embarazos media \pm DS
Pacientes con infertilidad primaria	47	33,4 \pm 5,0	--
Pacientes con aborto espontáneo	66	34,5 \pm 4,6	1,7 \pm 0,7
Grupo control	40	31,7 \pm 6,5	2,0 \pm 0,0

Anticuerpos antifosfolípidos: La incidencia de anticuerpos antifosfolípidos en los grupos estudio y control se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Incidencia de anticuerpos antifosfolípidos en pacientes con infertilidad primaria, pacientes con aborto espontáneo y grupo control

	Grupo con infertilidad primaria	Grupo control	pa	Grupo con aborto espontáneo	Grupo control	pa
anticuerpos antifosfolípidos ^b	6/47 (12,8%)	0/40	0,019	8/66 (12,1%)	0/40	0,022

^a Chi-cuadrado

^b Anticuerpos antifosfolípidos clase IgG o IgM

Los anticuerpos antifosfolípidos se encuentran más frecuentemente en mujeres con aborto espontáneo y mujeres con infertilidad primaria ($P < 0,025$) que en las mujeres pertenecientes al grupo control. En pacientes con infertilidad primaria 12,8% fue positivo para anticuerpos antifosfolípidos y el 12,1% de pacientes con aborto espontáneo fue positivo para anticuerpos antifosfolípidos.

Se analizó la incidencia de APL de acuerdo al número de abortos previos (Figura 1). La incidencia de APL en mujeres con uno o dos abortos previos fue 6,5% y 17,1% respectivamente. A pesar de que se observó un aumento en la incidencia de APL con un aborto adicional, este aumento no fue estadísticamente significativo.

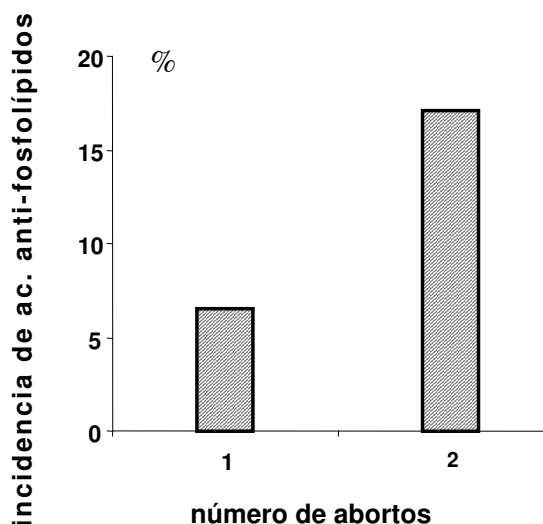


Figura 1. Incidencia de anticuerpos antifosfolípidos de acuerdo al número de abortos previos en pacientes con aborto espontáneo

Anticuerpos antinucleares: Las mujeres con infertilidad primaria mostraron una mayor incidencia de ANA ($P=0,003$) que el grupo control (Tabla 3). Una de las 47 pacientes con infertilidad primaria fue positiva para ANA y para APL. La incidencia de ANA en mujeres con aborto espontáneo fue mayor ($P = 0,007$) que la incidencia obtenida en el grupo control (Tabla 3). Una de las 66 pacientes con aborto espontáneo fue positiva para ANA y para APL.

Tabla 3. Incidencia de anticuerpos antinucleares en pacientes con infertilidad. primaria, pacientes con aborto espontáneo y grupo control.

anticuerpos antinucleares	Grupo con infertilidad primaria n= 47	Grupo control n=40	pa	Grupo con aborto espontáneo n= 66	Grupo control n=40	pa
Positivo	12 (25,5%)	1 (2,5%)	0,003	14 (21,2%)	1 (2,5%)	0,007
Negativo	35 (74,5%)	39 (97,5%)		52 (78,8%)	39 (97,5%)	

^aChi-cuadrado

DISCUSIÓN

El presente estudio en mujeres venezolanas confirma los reportes previos que asocian la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y anticuerpos antinucleares con infertilidad primaria y con aborto espontáneo (7,12,16). En este estudio se muestra que las mujeres con infertilidad primaria y con aborto espontáneo demuestran una mayor incidencia de anticuerpos antifosfolípidos y de anticuerpos antinucleares que las mujeres del grupo control. Muchos pasos en el establecimiento de un embarazo normal han sido implicados como posibles sitios de acción a través de los cuales los anticuerpos antifosfolípidos median el fallo reproductivo

(3,17,18). Se ha descrito que los anticuerpos anticardiolipina interfieren con la implantación al reaccionar directamente con el embrión preimplantado (19).

Los anticuerpos antifosfolípidos pueden alterar el desarrollo de la placenta y el feto al inducir eventos trombóticos en la placenta (4,6). Se ha demostrado que la fosfatidilserina tiene funciones de molécula de adhesión durante la formación de sincitio en células musculares lisas y fibroblastos (1,2). Además, se ha reportado que la fosfatidilserina es una molécula que se encuentra en los vellos de la membranas de las células placentarias (20). Se ha sugerido que los anticuerpos contra esta molécula de adhesión puede inhibir el proceso de transformación formación del citotrofoblasto en sincitiotrofoblasto lo que puede llevar a un fallo de la formación del órgano placentario (7). El fosfatidilinositol es otra molécula de adhesión importante en la formación de la placenta (21). La presencia de anticuerpos antifosfolípidos en la mujer embarazada puede resultar en un formación defectuosa de la placenta.

El presente estudio muestra una mayor incidencia de anticuerpos antinucleares en mujeres con infertilidad primaria y aborto espontáneo que en las mujeres del grupo control. Esto concuerda con los estudios previos que describen una asociación entre anticuerpos antinucleares, infertilidad primaria y aborto espontáneo (13,16,22,23). La alta incidencia de ANA encontrada en estas pacientes puede sugerir una implicación directa de estos anticuerpos en el fallo reproductivo. La presencia de anticuerpos antinucleares durante el embarazo produce un proceso inflamatorio en la placenta y en la decidua que puede conducir a un aborto espontáneo (24,25). Adicional a esto, se ha reportado elevados títulos de anticuerpos anti-dsDNA en mujeres que presentan aborto espontáneo recurrente (26).

En este estudio se observan autoanticuerpos aún antes de la primera pérdida de un embarazo. El seguimiento a largo plazo de nuestras pacientes es necesario para determinar el significado patológico de estos autoanticuerpos. Igualmente, son necesarios mayores estudios para aclarar el mecanismo fisiopatológico de las anomalías serológicas autoinmunes en mujeres con infertilidad primaria y en mujeres con aborto espontáneo.

BIBLIOGRAFIA

1. Sessions A, Horowitz AF. Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts. *FEBS Lett* 1981; 134:75-78.
2. Sessions A, Horowitz AF. Differentiation related differences in the plasma membrane phospholipid asymmetry of myogenic and fibrogenic cells. *Biochem Biophys Acta* 1983; 728:103-111.
3. Kutteh WH, Rote NS, Silver R. Antiphospholipids antibodies and reproduction: the antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:133-152.
4. Lockwood C J, Rand JH. The immunobiology and obstetrical consequences of antiphospholipids antibodies. *Obstet Gynecol Surg* 1994; 49:432-441.
5. Gris JC, Perneger TV, Mercier E, Fabbro-Peray P, Lavigne-Lissalde G, Hoffet M, Dechud H, Boyer JC, Ripart-Neveu S, Tailland ML, Dures JP, Mares P, Dautat M. Antiphospholipid/ antiprotein antibodies, hemostasis-related autoantibodies, and plasma homocysteine as risk factors for a first early pregnancy loss: a matched case-control study. *Blood* 2003; 102:3504-3513.
6. Ferro D, Saliola M, Quintarelli C, Valesini G, Basili S, Grandilli AM, Bonavita MS. Methods for detecting lupus anticoagulants and their relation to thrombosis and miscarriage in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 1992; 45:332-338.
7. Kwak JYH, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Beer AE. Autoantibodies in women with primary recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *J Reprod Immunol* 1992; 22:15-31.

8. Parazzini F, Acaia B, Ricciardiello O, Fedele L, Liata P, Candiani GB. Short term reproductive prognosis when no cause can be found for recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95:654-658.
9. Ornoy A, Yacobi S, Matalon Tartakover S, Blank M, Blumenfeld Z, Miller RK, Shoenfeld Y. The effects of antiphospholipid antibodies obtained from women with SLE/APS and associated pregnancy loss on rat embryos and placental explants in culture. *Lupus* 2003; 12:573-578.
10. Salmon JE, Girardi G, Holvers VM. Activation of complement mediates antiphospholipid antibodies-induced pregnancy loss. *Lupus* 2003; 12:535-538.
11. Matalon ST, Shoenfeld Y, Blank M, Yacobi S, Von Landdenberg P, Ornoy A. Antiphosphatidylserine antibodies affect rat yolk sacs in culture: a mechanism for fetal loss in antiphospholipid syndrome. *J Reprod Immunol* 2004; 51:144-151.
12. Cowchock FS, Smith JB, Gocial B. Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortions. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155:1002-1010.
13. Harger JH, Rabin BS, Marchese SG. The prognostic value of antinuclear antibodies in women with recurrent pregnancy losses: a prospective controlled study. *Obstet Gynecol* 1989; 73:419-424.
14. Bahar AM, Kwak JYH, Beer AE, Kim JH, Nelson LA, Beaman KD, Gilman-Sachs A. Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in non-pregnant women with unexplained spontaneous recurrent abortions. *J Reprod Immunol* 1993; 24:213-222.
15. Kallen C, Arici A. Immune testing in fertility practice: truth or deception?. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15:225-231.
16. Cubillos J, Lucena A, Lucena C, Mendoza JC, Ruiz H, Arango A, Quiroga G, Ferro J, Lucena E. Incidence of autoantibodies in the infertile population. *Early Pregnancy* 1997; 3:119-124.
17. Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction of antiphospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. *PNAS* 1991; 88:3069-3073.
18. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991; 49:193-280.
19. Sthoeger ZM, Mozes E, Tartakovsky B. Anti-cardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation. *PNAS* 1993; 90:6464-6467.
20. Rauch J, Janoff A. Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phase in vivo. *PNAS* 1990; 87:4112-4114.
21. Ohno T, Imai A, Furui A, Matsunami K, Matsuda T, Tamatya T. Evidence of a role for phosphatidylinositol synthesis in human amnion cell proliferation. *Biol Reprod* 1992; 47:730-735.
22. Ogasawara M, Aoki K, Katano K, Aoyama T, Kajjura S, Suzumori K. Prevalence of autoantibodies in patients with recurrent miscarriages. *J Reprod Immunol* 1999; 41:86-90.
23. Carbone J, Orera M, Rodriguez-Mahou M, Rodriguez-Perez C, Sanchez-Ramos S, Seoane E, Rodriguez J, Zabay JM, Fernandez-Cruz E. Immunological abnormalities in primary APS evolving into SLE: 6 years follow-up in women with repeated pregnancy loss. *Lupus* 1999; 8:274-278.
24. Guzman L, Avalos E, Orty R, Gurrola R, Lopez E, Herrera R. Placental abnormalities in systemic lupus erythematosus: in situ deposition of antinuclear antibodies. *J Rheumatol* 1987; 14:924-929.
25. Silver MM, Laxer RM, Laskin CA, Smallhorn JF, Gare DJ. Association of fetal heart block and massive placental infarction due to maternal autoantibodies. *Pediatr Pathol* 1992; 12:131-139.
26. Petri M, Golbus M, Anderson R, Whiting-O'Keefe Q, Corash L, Hellmann D. Antinuclear antibody, lupus anticoagulant and anticardiolipin antibody in women with idiopathic habitual abortion. *Arthritis Rheum* 1987; 30:601-606.