





**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Histología y Anatomía**



**ESTUDIO DE LA MICROTROMBOSIS  
RENAL EN EL LUPUS  
ERITEMATOSO SISTÉMICO Y SU  
CORRELACIÓN CON EL GRADO DE  
AFECTACIÓN INFLAMATORIA**

---

**MARÍA PAZ MARTÍNEZ VIDAL**

**TESIS DOCTORAL**

**ALICANTE, JUNIO 2015**

---



## **DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL:**

**DRA MARÍA GALINDO IZQUIERDO**

**DR FRANCISO SÁNCHEZ DEL CAMPO**





## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar, en primer lugar, mi más sincero agradecimiento a la Doctora María Galindo. No sólo ha sido mi directora de tesis, sin cuya idea original y meticulosa supervisión ésta no habría sido posible; ha sido también mi referente como médico, y ha sido sobre todo mi amiga. Es un modelo a seguir como facultativo, como investigadora pero más aún como persona. Muchas gracias, querida amiga, por tu dedicación y por tu paciencia; trabajar contigo significa no parar de aprender.

Quiero agradecer al profesor Sánchez del Campo su inestimable papel en todo el proceso desde la elección inicial del programa de doctorado, siguiendo por el trabajo de suficiencia investigadora y por último toda la ayuda en la orientación y preparación de la lectura de la tesis. Su vocación docente es un don que perdurará en la memoria de los incontables médicos que hemos tenido la suerte de ser sus alumnos.

Quiero dar las gracias a los miembros del tribunal de mi tesis. Son todos reconocidos expertos en sus ámbitos de trabajo, que han hecho el esfuerzo de ajustar sus agendas y desplazarse para estar presentes en mi tesis. Es un honor haber podido contar con ellos y me siento profundamente agradecida.

Desearía agradecer a la Secretaria del Departamento, Marga para los estudiantes, su amable ayuda en todo el trámite administrativo. Su disponibilidad y cercanía, pero sobre todo su perpetua sonrisa son un bálsamo en los agitados meses previos a la lectura de la tesis.

En último lugar, pero no menos importante, quiere agradecer a mi familia todo el apoyo

y el cariño. No sólo para realizar mi tesis, sino cada día de mi vida. Cada pequeño éxito se multiplica al compartirlo con ellos, y son mi trampolín para el siguiente salto. Os quiero.





# ÍNDICE

<b>1. – ABREVIATURAS EN EL TEXTO</b> .....	9
<b>2.- INTRODUCCIÓN</b> .....	11
2.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	13
2.1.1- NEFROPATÍA LÚPICA.....	16
2.1.1A- PATRONES HISTOLÓGICOS DE AFECTACIÓN GLOMERULAR EN LA NEFROPATÍA LÚPICA.....	18
2.1.1B- PATRONES HISTOLÓGICOS DE AFECTACIÓN VASCULAR EN LA NEFROPATÍA LÚPICA.....	22
2.2 SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO.....	27
2.2.1 ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDO: TIPOS.....	31
2.2.2 PAPEL PATOGENICO DE LOS AUTO ANTICUERPOS EN EL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO.....	36
2.2.3 MECANISMOS PATOGENICOS DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO.....	38
2.2.4 MANIFESTACIONES RENALES DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO.....	43
2.3 MARCADORES DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.....	47
2.4 MARCADORES DE INFLAMACIÓN ASOCIADOS A MICROTROMBOSIS.....	49
<b>3.-HIPÓTESIS</b> .....	51
<b>4.- OBJETIVOS</b> .....	53

<b>5.- RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	55
5.1 ARTÍCULOS.....	56
5.2 RESUMEN DE RESULTADOS.....	57
5.2.1 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MICROTROMBOS PLAQUETARIOS EN PACIENTES CON NEFROPATÍA LÚPICA Y APL.....	57
5.2.2 CORRELACIÓN DE MICROTROMBOSIS RENAL CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN LA NEFROPATÍA LÚPICA.....	58
<b>6.- DISCUSIÓN</b> .....	61
<b>7.- CONCLUSIONES</b> .....	75
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	77
<b>9.- ANEXOS</b> .....	95
9.1 ANEXO1: <i>Immunohistochemical detection of intravascular platelet microthrombi in patients with lupus nephritis and antiphospholipid antibodies.</i> ....	95
9.2 ANEXO 2: <i>Clinicopathologic correlations of renal microthrombosis and inflammatory markers in proliferative lupus nephritis.</i> ....	103
9.3 ANEXO 3: SLEDAI.....	113

# 1. ABREVIATURAS EN EL TEXTO

ACF: atrofia cortical focal  
aCL: anticuerpos anticardiolipina  
ACR: *American College of Rheumatology*  
AHM: anemia hemolítica microangiopática  
AL: anticoagulante lúpico  
ANA: anticuerpos antinucleares  
aPL: anticuerpos antifosfolípido  
a $\beta$ 2GP-I: anticuerpos anti beta2-glicoproteína I  
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*  
GC: glucocorticoides  
GN: glomerulonefritis  
HE: hematoxilina-eosina  
HFI: hiperplasia fibrosa de la íntima  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HTA: hipertensión arterial  
IC: inmunocomplejos  
IFD: inmunofluorescencia directa  
Ig: inmunoglobulin  
IgA: inmunoglobulina A  
IgG: inmunoglobulina G  
IgM: inmunoglobulina M  
IHQ: inmunohistoquímica  
LDL: *low density lipoproteins*  
LES: lupus eritematoso sistémico  
MAT: microangiopatía trombótica  
ME: microscopio electrónico  
MO: microscopio óptico  
NL: nefritis lúpica  
NSAF: nefropatía del síndrome antifosfolípido  
PAS: ácido periódico-Schiff  
PCR: proteína C reactiva  
PTT: púrpura trombótica trombocitopénica  
SAF: síndrome antifosfolípido  
SDC-1: syndecan-1  
SLEDAI: *systemic lupus erythematosus disease activity index*  
TGF- $\beta$ 1: factor transformador del crecimiento beta 1  
TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado  
OMS: Organización Mundial de la Salud



## 2. INTRODUCCIÓN





## 2.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad multisistémica autoinmune de etiología desconocida que afecta a diversos órganos. Se caracteriza por una alteración en la autorregulación del sistema inmunológico que conduce a la producción de autoanticuerpos, formación de complejos inmunes circulantes y activación del sistema del complemento. La causa que subyace a esta producción de autoanticuerpos sigue siendo un área de investigación actualmente, aunque se conocen diversas alteraciones del procesamiento antigénico. Se ha observado una respuesta desproporcionada de células B, regulación deficiente de los mecanismos de tolerancia, y defectos en el aclaramiento de inmunocomplejos (IC) por diferentes mecanismos. El depósito de estos IC en distintos órganos, y la respuesta inflamatoria subsecuente son la base fundamental de los fenómenos inflamatorios que conducen a los signos de LES.

Se trata de una enfermedad relativamente frecuente, de distribución universal. Se ha comunicado una prevalencia variada según las poblaciones de estudio, que puede oscilar entre 20 y 150 casos por 100.000 habitantes (Lawrence RC *et al*, 1998; Chakravarty EF *et al*, 2007; Feldman CH *et al*, 2013). Esta prevalencia oscila ampliamente según las características de las poblaciones, la etnia, la edad y los métodos de recogida de los diferentes estudios. Es más frecuente en afroamericanos, hispanos y asiáticos (Hochberg MC, 1985; McCarty DJ *et al*, 1995), pudiendo ser además más grave en estos grupos étnicos debido probablemente a factores genéticos pero también culturales y económicos. Además, la incidencia ha aumentado debido a la mejor detección de la enfermedad, de manera que casi se ha triplicado en la segunda mitad del siglo XX (Uramoto KM *et al*, 1999)

La relación mujer: varón es de 10:1, aunque esta proporción disminuye si el LES se presenta en la edad infantil o por encima de los 65 años (López P *et al*, 2003). En la mayoría de los casos la sintomatología inicial ocurre entre los 15 y los 40 años. Los síntomas más frecuentes ocurren en el aparato locomotor. Entre el resto de órganos y sistemas con potencial afectación, destaca el riñón por su frecuencia y por su gravedad. Los criterios que se siguen para el diagnóstico son los criterios de clasificación publicados por *The American College of Rheumatology* (ACR) (Hochberg MC, 1997) (Tabla 1).





TABLA 1: Criterios revisados para la clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico de 1997.

1. RASH MALAR. Eritema fijo plano o elevado sobre la eminencia malar con tendencia a respetar los pliegues nasolabiales.
2. RASH DISCOIDE. Placas eritematosas elevadas con escamas queratósicas adherentes y tapones foliculares; a veces retracción en las lesiones antiguas.
3. FOTOSENSIBILIDAD. Rash cutáneo como resultado de reacción anormal a la luz solar, según historia clínica o examen físico.
4. ULCERAS ORALES. Ulceración oral o nasofaríngea, habitualmente indolora, observada por un médico.
5. ARTRITIS. No erosiva en 2 ó más articulaciones periféricas. Caracterizada por: hipersensibilidad al tacto, dolor a la presión, hinchazón o derrame articular.
6. SEROSITIS.
  1. Pleuritis: historia de dolor pleurítico, o roce pleural, o derrame pleural.
  2. Pericarditis: documentada por electrocardiograma, o roce pericárdico, o derrame pericárdico.
7. TRASTORNOS RENALES.
  3. Proteinuria persistente: mayor de 0,5 gr/día o mayor de 3 + si no se cuantifica, o
  4. Cilindros celulares: eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.
8. TRASTORNOS NEUROLOGICOS.
  - a. Convulsiones: en ausencia de toxicidad medicamentosa y alteraciones metabólicas conocidas como uremia, cetoacidosis y alteraciones electrolíticas, o
  - b. Psicosis: en ausencia de todos los factores descritos en párrafo anterior.
9. TRASTORNOS HEMATOLOGICOS.
  - a. Anemia hemolítica con reticulocitosis, o
  - b. Leucopenia menor de 4000 en 2 ó más ocasiones, o
  - c. Linfopenia menor de 1500 en 2 ó más ocasiones, o
  - d. Trombocitopenia menor de 100.000 en ausencia de toxicidad medicamentosa.
10. TRASTORNOS INMUNOLOGICOS.
  - a. Células LE positivas, o
  - b. Anticuerpos anti DNA nativo, o
  - c. Anticuerpos anti Sm, o
  - d. Pruebas serológicas falsas positivas para sífilis: por lo menos 6 meses consecutivos. Confirmadas por: inmovilización Treponema; FTA abs.
11. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES. Un título anormal de ANA por inmunofluorescencia o por una prueba equivalente en cualquier momento y en ausencia de medicamentos implicados en Síndrome Lupus inducido.

REQUISITOS PARA CLASIFICACIÓN: 4 o más de 11 criterios. Sensibilidad 95%, Especificidad 85%.

### **2.1.1 NEFROPATÍA LÚPICA**

La afectación del riñón o nefropatía lúpica (NL), cuyas manifestaciones principales son la hipertensión arterial (HTA) y la proteinuria, se desarrolla entre el 30% y el 50% de los pacientes con LES, incluso más en pacientes pediátricos (Cameron JS, 1999) y es una importante causa de morbilidad y mortalidad (Faurischou M *et al*, 2010). Según las guías ACR (Gladman DD *et al*, 1999) se define NL por: a) la presencia de proteinuria persistente de 0,5g al día o presencia de proteinuria +++ en la tira de orina si no se ha cuantificado; o b) cilindros celulares ya sean de glóbulos rojos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos. Recientemente se han revisado las guías para el manejo de la NL (Hahn BH *et al*, 2012), y se ha perfilado que la proteinuria en 24 horas puede ser sustituida por el cociente creatinina/proteína >0.5, y la presencia de cilindros celulares puede ser sustituido por “sedimento urinario activo” que se define como >5 glóbulos rojos por campo, >5 glóbulos blancos por campo en ausencia de infección, o presencia de cilindros celulares aunque sean exclusivamente de glóbulos rojos o blancos. Se añade también que el criterio óptimo para el diagnóstico de NL es una biopsia renal que muestra la presencia de glomerulonefritis (GN) mediada por IC compatible con NL.

La mayoría de las alteraciones a nivel renal se ponen de manifiesto entre los 3-5 años tras el diagnóstico de LES (Seligman VA *et al*, 2002). Se ha descrito una prevalencia variable de la NL y diversos factores clínicos y demográficos han mostrado tener relación con el pronóstico (Mok CC, 2005). En la práctica clínica habitual en los pacientes con LES, se lleva a cabo una biopsia renal cuando existe la sospecha de nefropatía en base a parámetros clínicos o analíticos. Aunque algunos datos clínicos tales como la elevación de la creatinina o cifras tensionales elevadas persistentes han mostrado valor pronóstico, la información histológica obtenida del estudio de la biopsia sigue siendo indispensable para la clasificación de las lesiones así como para determinar la evolución y el pronóstico (Esdaile JM *et al*, 1991; Austin HA *et al*, 1995). Los parámetros clínicos y analíticos por sí mismos pueden subestimar la incidencia real de afectación renal, dado que algunos pacientes tienen

alteraciones significativas en el estudio patológico sin haber mostrado ningún signo de afectación renal (NL silente) (González-Crespo MR *et al*, 1996).

La biopsia renal es por tanto un método imprescindible en el diagnóstico de los pacientes con LES y afectación renal. Este procedimiento permite realizar un diagnóstico preciso y dirigir el mejor enfoque terapéutico, y además aporta la información para establecer el pronóstico renal.

Klemperer y su equipo (Klemperer P *et al*, 1984) fueron los primeros que describieron al microscopio óptico (MO) la histopatología renal de la GN lúpica tal como la conocemos actualmente. Las lesiones inicialmente descritas fueron la proliferación celular, las asas de alambre, los cuerpos hematoxilínicos y la presencia de trombos de fibrina en muestras de autopsias de pacientes sin tratamiento.

Con respecto a la etiopatogenia de la afectación renal en el LES, la afectación glomerular mediada por IC es la más común (Balow JE y Austin HA, 1998) aunque hay otros tipos. Además de las GN, deben tenerse en cuenta las lesiones vasculares ya que su presencia empeora el pronóstico renal (Banfi G *et al*, 1991; Appel GB *et al*, 1994). Varios estudios han comunicado mayor frecuencia de HTA, fibrosis y en general peor pronóstico en los casos de afectación vascular renal. La histología del corpúsculo renal se detalla en la Figura 1.

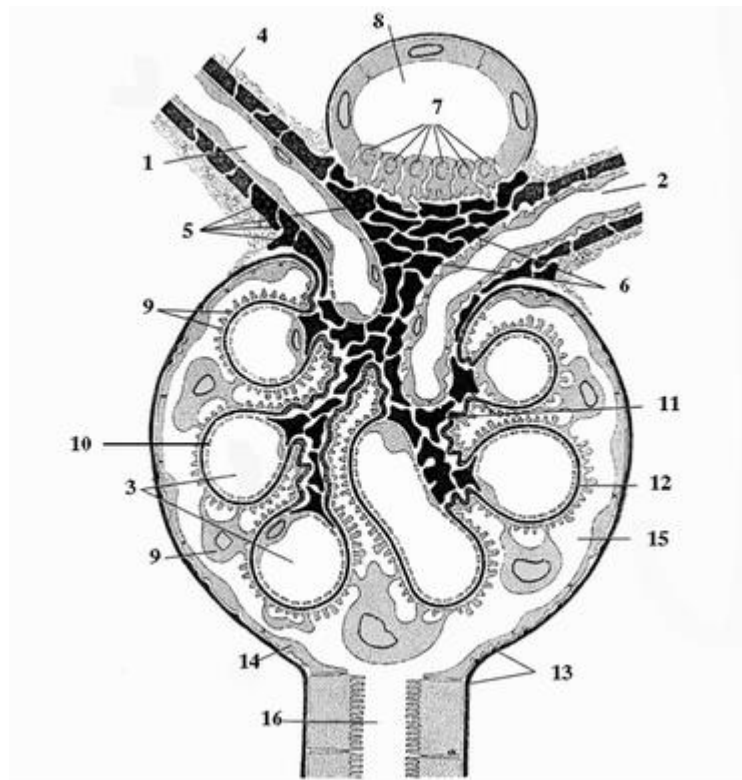


FIGURA 1: **Sección longitudinal de un corpúsculo renal y del aparato yuxtaglomerular.** 1) Arteriola aferente. 2) Arteriola eferente. 3) Capilares glomerulares. 4) Músculo liso vascular. 5) Células yuxtaglomerulares. 6) Lacis. 7) Mácula densa. 8) Túbulo distal. 9) Podocitos. 10) Células endoteliales. 11) Células mesangiales. 12) Membrana basal capilar glomerular. 13) Membrana basal. 14) Epitelio parietal. 15) Espacio de Bowman. 16) Túbulo proximal. (Adaptado de Somlo y Mundel, 2000.)

### 2.1.1A. PATRONES HISTOLÓGICOS DE AFECTACIÓN GLOMERULAR EN PACIENTES CON NEFROPATÍA LÚPICA

Se sabe que los patrones de afectación glomerular mediada por IC dependen del lugar en que se acumulen o depositen las Ig, su especificidad antigénica, su capacidad de fijar y activar el complemento y otras proteasas séricas y de su capacidad para desencadenar una respuesta inflamatoria (Fries JW *et al*, 1988). Estos patrones de afectación glomerular pueden clasificarse en tres grupos: mesangial, endotelial y epitelial, y la clínica vendrá dada en gran parte por el lugar de

afectación predominante.

La primera clasificación de la NL de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se formuló por Pirani y Pollak, en Buffalo, Nueva York en 1974 (Tabla 2) y fue usada por primera vez en 1975 en una publicación (McCluskey RT, 1975). Como puede observarse, esta clasificación inicial se centra exclusivamente en la afectación glomerular.

TABLA 2: Clasificación original OMS de nefropatía lúpica en 1974.

<b>CLASE I</b>	Glomérulos normales por microscopía óptica (MO), inmunofluorescencia (IF) y microscopía electrónica (ME).
<b>CLASE II</b>	Afectación exclusivamente mesangial: a) Mesangio normocelular al MO pero presencia de depósitos en IF o ME. b) Mesangio hiper celular con depósitos en IF o ME.
<b>CLASE III</b>	Glomerulonefritis proliferativa focal (afecta a <50% de los glomérulos).
<b>CLASE IV</b>	Glomerulonefritis proliferativa difusa (afecta a $\geq$ 50% de los glomérulos).
<b>CLASE V</b>	Glomerulonefritis membranosa.

En 1982 se realizó una modificación de la clasificación de la OMS tratando de incorporar los nuevos avances en el estudio de la NL. La Clase I se subdividió de acuerdo con la presencia o ausencia de depósitos inmunes en el mesangio. La Clase II se aplicó exclusivamente a las GN proliferativas mesangiales, y se dividió en dos subcategorías basándose en la severidad del infiltrado celular mesangial. En la Clase IV se realizaron subdivisiones según el grado de la proliferación mesangial, los hallazgos membranoproliferativos o la extensión de los depósitos inmunes subendoteliales en ausencia de proliferación endocapilar. Además se introdujeron subdivisiones para los tipos III y IV en base a la presencia de lesiones activas, crónicas o mixtas. La Clase V también se subdividió

considerando la presencia de hiper celularidad mesangial. Se introdujo una nueva Clase VI para la GN avanzada esclerosante, sin definir claramente el porcentaje de glomérulos requeridos. Esta clasificación resultó farragosa de aplicar, a la par que poco intuitiva, de manera que la mayoría de patólogos seguía usando la clasificación de 1974.

Se han propuesto modificaciones posteriores de la clasificación de la NL, y todas se ciñen exclusivamente a la afectación glomerular. Actualmente parece haberse llegado al acuerdo de definir la NL mediante la clasificación ISN/RPS (de, *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society*) (Weening JJ *et al*, 2004), ya que sobre las descripciones básicas glomerulares de la clasificación de la OMS original puede describirse además la afectación de acuerdo con el grado de actividad y cronicidad. Por primera vez se recomienda evaluar también índices de actividad para las lesiones tubulares y vasculares (Tabla 3).

En la GN clase I el examen por MO es normal y sólo por IF se pueden apreciar mínimos depósitos mesangiales. La GN clase II muestra en examen al MO hiper celularidad mesangial o expansión de la matriz con depósitos inmunes confinados al mesangio en la IF. La GN clase III se caracteriza por la presencia de depósitos inmunes subendoteliales y cambios proliferativos que afectan a <50% de los glomérulos. En la GN clase IV se observan depósitos subendoteliales y cambios proliferativos en  $\geq$  del 50% de los glomérulos. La GN clase V se caracteriza por depósitos subepiteliales y engrosamiento de la membrana del capilar glomerular.

TABLA 3: Clasificación internacional ISN/RPS 2003 para la nefropatía lúpica.

<b>CLASE I</b>	<b>NEFROPATÍA LÚPICA MESANGIAL DE CAMBIOS MÍNIMOS</b> Glomérulos normales al MO, pero depósitos mesangiales por IF
<b>CLASE II</b>	<b>NEFROPATÍA LÚPICA MESANGIAL PROLIFERATIVA</b> Hiper celularidad mesangial exclusivamente de cualquier grado, o expansión de la matriz al MO con presencia de depósitos inmunes.
<b>CLASE III</b>	<b>NEFROPATÍA LÚPICA FOCAL*, **</b> Glomerulonefritis focal activa o inactiva, segmentaria o global que afecta a <50% de los glomérulos; presencia de depósitos inmunes subendoteliales focales, con o sin afectación de mesangio  CLASE III (A) lesiones activas: nefropatía proliferativa CLASE III (A/C) lesiones activas y crónicas: nefropatía proliferativa focal y esclerosante CLASE III (C) lesiones crónicas inactivas con cicatrices glomerulares: nefropatía esclerosante focal
<b>CLASE IV</b>	<b>NEFROPATÍA LÚPICA DIFUSA*, **</b> Glomerulonefritis difusa activa o inactiva, segmentaria o global que afecta a ≥50% de los glomérulos; presencia de depósitos inmunes subendoteliales difusos, con o sin afectación mesangial. Puede haber depósitos en asa de alambre pero sin proliferación glomerular. Se subdivide en dos clases. CLASE IV-S: nefropatía difusa <b>segmentaria</b> si las lesiones que se observan en ≥50% de los glomérulos son segmentarias. Segmentaria se define como una lesión glomerular que afecta a menos de la mitad del ovillo. CLASE IV-G: nefropatía difusa <b>global</b> si ≥50% de los glomérulos afectados muestran lesiones globales.  CLASE IV-S (A) lesiones activas: nefropatía proliferativa difusa segmentaria CLASE IV-G (A) lesiones activas: nefropatía proliferativa difusa global CLASE IV-S (A/C) lesiones activas y crónicas: nefropatía proliferativa y esclerosante difusa segmentaria CLASE IV-G (A/C) lesiones activas y crónicas: nefropatía proliferativa y esclerosante difusa global CLASE IV-S (C) lesiones crónicas inactivas con cicatrices glomerulares: nefropatía difusa esclerosante segmentaria CLASE IV-G (C) lesiones crónicas inactivas con cicatrices glomerulares: nefropatía difusa esclerosante global
<b>CLASE V</b>	<b>NEFROPATÍA LÚPICA MEMBRANOSA</b> Depósitos inmunes subepiteliales globales o segmentarios, o su secuelas morfológicas por MO, IF o EM, con o sin alteraciones mesangiales. La clase V puede presentarse en combinación con las clases III y IV. También puede encontrarse con esclerosis avanzada
<b>CLASE VI</b>	<b>NEFROPATÍA LÚPICA ESCLEROSANTE AVANZADA</b> Esclerosis ≥90% de los glomérulos sin presencia de actividad residual
	*Indica la proporción de glomérulos con lesiones activas y con lesiones escleróticas ** Indica la proporción de glomérulos con necrosis fibrinoide y con crecimiento celular

## 2.1.1B. PATRONES HISTOLÓGICOS DE AFECTACION VASCULAR

### RENAL EN PACIENTES CON NEFROPATÍA LÚPICA

La afectación del árbol vascular aunque no es un criterio para el diagnóstico de LES es una de las lesiones más características de la enfermedad, ya que entre 30 y 40% de los pacientes con lupus padecerán manifestaciones vasculares, inflamatorias o no, en algún momento. La vasculopatía lúpica más frecuente ocurre en la piel, ya que se ha descrito hasta por encima del 90% de los casos en algunas series (Zecevic RD *et al*, 2001), pero puede afectar a cualquier órgano.

Como ya se ha comentado previamente, las manifestaciones de afectación renal pueden ocurrir hasta en el 50% de los pacientes con LES. Además de las lesiones glomerulares, debe tenerse en cuenta que las lesiones vasculares en el riñón de los pacientes con LES pueden ser de causa inflamatoria, trombótica o secundarias a patología de los podocitos.

La frecuencia real de cada tipo de vasculopatía renal en el lupus se desconoce ya que durante varias décadas los estudios han estado enfocados a la patología glomerular y no existe un protocolo estandarizado para la observación de las lesiones vasculares en la afectación renal. A esta dificultad para catalogar las lesiones vasculares se añade el hecho de que distintos tipos de lesión pueden coexistir, y resulta complejo separarlas completamente.

- En las lesiones vasculíticas el sustrato es claramente inflamatorio y se encuentran depósitos inmunes en casi todos los casos en el mesangio y con menor frecuencia en la pared capilar.

- La formación de trombos puede estar asociada al grado de inflamación renal o puede estar relacionada con actividad autoinmune. Es sabido que el hallazgo de trombos de fibrina glomerulares puede estar asociado a la NL proliferativa (Kant KS *et al*, 1981); en presencia de inflamación glomerular intensa puede producirse la formación de trombos como resultado de una activación endotelial o lesión vascular con activación del sistema de la coagulación. En presencia de los anticuerpos antifosfolípido (aPL) o el anticoagulante lúpico (AL), puede desencadenarse trombosis en las arterias, las venas y los capilares glomerulares lo cual se conoce como síndrome antifosfolípido



(SAF) (Hughes GR *et al*, 1986). Sin que se haya objetivado relación con el grado inflamación, también pueden formarse trombos como en el caso de la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT)-*like* asociada a LES, una lesión raramente observada (Hamasaki K *et al*, 2003) y que se relaciona con la presencia de anticuerpos anti ADAMTS-13 como causa de la deficiencia adquirida en la proteasa del factor von Willebrand, similar a la que se observa en pacientes con PTT (Mannucci PM *et al*, 2003; Rieger M *et al*, 2005).

- En algunos pacientes con LES, el síndrome nefrótico puede deberse a una alteración en los podocitos, sin que se acompañe de depósito de IC que ocasione dicho daño. Las lesiones que se observan en el endotelio glomerular son idénticas a las descritas en la GN de cambios mínimos. Dado que no se ha podido demostrar un origen autoinmune ni inflamatorio, se han propuesto distintos mecanismos en la patogenia de estas lesiones, como la liberación alterada de IL-13 por parte de linfocitos T aberrantes (Cunard R y Kelly CJ, 2002) o el daño directo producido por la interacción entre las células dendríticas renales y las células TH específicas y la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-23 (Heymann F *et al*, 2009).

Disponemos de tres métodos para el estudio histológico de las lesiones vasculares renales: MO, ME e inmunofluorescencia directa (IFD). Las muestras para el estudio por MO precisan ser fijadas e incluidas en parafina. Entre los materiales más comúnmente utilizados están la fijación de Zenker y la tinción con hematoxilina-eosina (HE) y ácido periódico-Schiff (PAS). En la actualidad, la ME es esencial en el estudio de la NL ya que diversos cuadros siguen aún diagnosticándose de acuerdo con los hallazgos de la ME. Para ello, la muestra debe ser fijada en glutaraldehído, incluida en una resina epoxy y teñida con azul de toluidina. Finalmente, la IFD es la mejor técnica para detectar depósitos inmunes en el tejido renal, usando suero anti inmunoglobulinas -IgG, -IgA, -IgM; anti -C1q, -C3, -C4 o anti-fibrinógeno. Para ello, el tejido debe ser congelado en nitrógeno líquido.

En los años 90, se publicaron dos revisiones extensas donde se describieron los principales subtipos histológicos de lesiones vasculares en pacientes con NL (Appel GB *et al*, 1994; Descombes

E *et al*, 1997). Las lesiones se clasificaron en:

1) Vasculopatía necrotizante no inflamatoria: lesión observada predominantemente en arteriolas preglomerulares y, en menor medida, interlobulares. Esta lesión se caracteriza por cambios necrotizantes en la pared vascular y la presencia de trombos hialinos ocluyendo el capilar glomerular y/o la luz arterial, tinción PAS+, siendo lo más característico de este tipo de lesión que no se acompaña de infiltrado inflamatorio. Por IFD se puede detectar la presencia abundante de IgG, IgM, IC y componentes de fibrina en la pared y la luz. Al ME estos depósitos son densos y suelen tener una textura granular, extendiéndose habitualmente bajo el endotelio intacto o rodeando los miocitos de la media en la membrana basal. Por su distribución focal podrían considerarse infrecuentes y pasar desapercibidas en una biopsia. Este tipo de vasculopatía debería diferenciarse de la hialinosis, frecuentemente asociada a la HTA y la arteriosclerosis.

2) Microangiopatía trombótica (MAT): caracterizada por la presencia de trombos en las arterias, arteriolas y lecho capilar glomerular formados mayoritariamente por fibrina, fragmentos de eritrocitos y leucocitos en la luz del vaso. Los cambios son difíciles de separar de la vasculopatía necrotizante, ya que afecta a arteriolas preglomerulares, pequeñas interlobulares pero también el lecho vascular del capilar glomerular.

Histológicamente, los cambios son idénticos a los que se observan en el síndrome hemolítico urémico, la PTT, esclerodermia e HTA maligna (Tsai HM, 2012).

En la fase aguda se observa un marcado estrechamiento luminal u oclusión total a causa de un depósito eosinofílico con propiedades de tinción de la fibrina en la luz, subendotelio o media, siempre asociado a edema del endotelio. La diferencia con la vasculopatía necrotizante no inflamatoria es la ausencia de depósitos en ME y en IFD, y la predominancia de la fibrina. En la fase crónica se observa edema mucoide de la íntima y/o fibroplasia de la íntima en “piel de cebolla”.

No se conoce bien la patogenia de las lesiones en todos los casos.

La MAT típicamente puede encontrarse en los vasos renales de pacientes con LES y SAF o PTT, pero podría desarrollarse de forma independiente a un proceso autoinmune o trombótico subyacente, ya que estas lesiones vasculares se han podido observar también en pacientes que recibían tratamiento con ciclosporina (microangiopatía en el rechazo al trasplante renal) (Remuzzi G y Bertani T, 1989).

La PTT y el LES coexisten en algunos casos, lo que podría plantear un origen similar en la patogenia de ambas. La PTT produce oclusión microtrombótica de pequeños vasos en muchos órganos, con lesiones agudas con trombos o lesiones residuales con engrosamiento fibromuscular de la íntima y cambios de isquemia. Sin embargo hay muy pocos casos publicados con la descripción específica de la histología en el riñón (Musio F *et al*, 1998).

- En el caso de los aPL, es difícil establecer exactamente su papel en la trombosis del capilar glomerular, ya que como se ha comentado anteriormente se han encontrado en formas activas de NL sin que se haya objetivado la presencia de aPL (Kant KS *et al*, 1981).
- La anemia hemolítica microangiopática (AHM) es una forma de anemia hemolítica por causa de defectos de los hematíes o por cualquier factor que cause daño en el endotelio o depósito de fibrina en estos microvasos, creando puntos de impacto en donde el glóbulo rojo circulante se fragmenta con consecuente lisis celular. El origen de la AHM puede ser mecánico, infeccioso o inmune. También se ha descrito asociada a MAT. Hu y su equipo (Hu WX *et al*, 2010) describieron la presencia de AHM y presencia de esquistocitos en el 60% de pacientes con NL y MAT. Por ello, la detección de marcadores séricos de AHM podría ser de utilidad para determinar la presencia de MAT complicando una NL. El mismo equipo describió también la presencia de niveles elevados en sangre de células endoteliales circulantes y trombomodulina soluble en pacientes con NL y MAT (Yao GH *et al*, 2008).

- 3) Vasculitis renal: bajo esta categoría se engloban las lesiones con morfología idéntica a la descrita en la poliangeítis microscópica, un prominente infiltrado inflamatorio de la pared arterial por neutrófilos y linfocitos mononucleares que afecta al vaso de pequeño y mediano calibre (comúnmente las arterias intralobulares) de manera excéntrica o circunferencial. Esta inflamación se acompaña de necrosis fibrinoide en una fase aguda más llamativa en la íntima y algo menor en la media. En la IFD se evidencian componentes derivados de fibrina; pueden hallarse esporádicos fragmentos de Ig o de complemento, que sugieren un atrapamiento de proteínas circulantes en la pared arterial dañada más que su causa. Aunque hay muy escasas descripciones de ME, no se han encontrado depósitos electrodensos asociados a estas lesiones. Se han comunicado tan pocos casos que se plantea la duda de si no se tratará de una superposición de LES con poliangeítis microscópica.
- 4) Engrosamiento fibroso de la íntima y arteriosclerosis: son consideradas lesiones vasculares escleróticas inespecíficas, y definidas como un engrosamiento de la íntima sin necrosis, proliferación ni trombosis. Puede encontrarse proliferación o trombosis, pero en este caso sí aparecerían asociadas a la presencia de depósitos hialinos subendoteliales.
- 5) Depósitos no complicados de IC en la pared de arteriolas y venas, siendo por otra parte la lesión más frecuente en LES. Los vasos se muestran normales al MO, sin necrosis, trombosis ni infiltrado inflamatorio de la pared, y sin compromiso de la luz. Por IFD puede haber depósitos focales de Ig y complemento. Estos depósitos se detectan más comúnmente bajo el endotelio vascular intacto o en la membrana basal. Se han observado sobre todo en GN proliferativas activas (III y IV), y llama la atención que de forma típica se asocian a depósitos tubulointersticiales. Se ha sugerido que el origen de los acúmulos pueda deberse al depósito de IC circulantes, aunque no se descarta la formación de IC *in*

*situ*. Sin embargo los depósitos en las paredes vasculares no incitan proliferación celular, tal y como ocurriría en la GN tipo II.

## 2.2 SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

El SAF se define por la presencia de al menos un evento trombótico venoso, arterial o morbilidad del embarazo, y la presencia en plasma de AL o al menos un tipo de aPL.

Los principales anticuerpos conocidos con efecto antifosfolípido son los anticuerpos anticardiolipina (aCL) y los anticuerpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I (a- $\beta$ 2GP-I). La presencia de estos autoanticuerpos, dirigidos contra elementos fosfolipídicos constituyentes de la vía intrínseca en la cascada de la coagulación, confiere un estado de potencial hipercoagulabilidad que puede afectar a cualquier segmento del árbol vascular arterial o venoso.

El SAF fue descrito por primera vez en aquellos pacientes con LES con una prueba de AL anormal, pero puede darse en ausencia de otras enfermedades. En la población general se ha estimado que el SAF primario es la causa más común de trombofilia adquirida y esta enfermedad es responsable del 15% al 20% de todos los episodios de trombosis venosa (TV) profunda con o sin embolismo pulmonar, de la tercera parte de los accidentes cerebrovasculares que ocurren en pacientes menores de 50 años, y del 10% al 15% de las mujeres con pérdidas fetales recurrentes (Ginsburg KS *et al*, 1992). Se ha estimado que del 2% al 5% de la población general ha tenido algún episodio de trombosis venosa profunda (Cushman M *et al*, 2004). Por tanto, la prevalencia de trombosis asociada con SAF puede ser alta, como del 0,3% al 1% de la población general.

Se sabe que en pacientes con LES, el SAF es responsable de una proporción significativa de

enfermedad tromboembólica y de pérdidas fetales recurrentes. Los aPL están presentes en un 30% a 40% de los pacientes con LES, y de ellos una tercera parte presentan manifestaciones clínicas de SAF (Petri M, 2000; McClain MT *et al*, 2004).

La primera referencia sobre aPL data del año 1952, cuando Moore y Mohr (Moore JE y Mohr CF, 1952) describieron un grupo de pacientes con LES que presentaban persistentes resultados falsos positivos en la prueba de VDRL para sífilis. Esta prueba está basada en la reacción de los anticuerpos del paciente contra cardiolipinas, En el mismo año, Conley y Hartmann, describieron dos pacientes con LES que presentan un inhibidor de la coagulación en suero (Conley CL y Hartmann RC, 1952). Este fue el punto de partida para comenzar a comprender que estos anticoagulantes podían inhibir los ensayos de coagulación *in vitro*; sin embargo no estaban relacionados con hemorragias espontáneas, a menos que hubiera otra coagulopatía presente. Se tardó poco tiempo en introducir el término “anticoagulante lúpico” para describir este fenómeno (Rapaport SI *et al*, 1960), y la relación entre este factor anticoagulante con eventos trombóticos en el LES fue comunicada más tarde (Fenstein DI y Rapaport SI, 1972; Mueh JR *et al*, 1980). La asociación entre el factor AL y los test falsos positivos para sífilis condujo al desarrollo de un inmunoensayo cuantitativo para determinar específicamente anticuerpos frente a cardiolipina, y al establecimiento de la relación entre los aCL, su relación con el test positivo para AL y la trombosis (Harris EN *et al*, 1983; Hughes GR, 1983; Loizou S *et al*, 1985). Un tiempo después, las pacientes que presentaban una combinación de trombosis con pérdidas de embarazo empezaron a ser diagnosticadas con el novedoso diagnóstico de "síndrome anticardiolipina", que luego fue renombrado a “síndrome antifosfolípido” (Hughes GR *et al*, 1986; Gharavi AE *et al*, 1987). A partir de este momento se desarrollan trabajos para tratar de cuantificar e identificar de manera uniforme la positividad de los aPL y su significado patológico.

En 1990 tres grupos independientes identificaron a la  $\beta_2$ GP-I como el cofactor en plasma requerido para que los aCL se unieran a la cardiolipina (Galli M *et al*, 1990; McNeil HP *et al*, 1990; Lo SC *et al*, 1990).

A pesar de haber sido inicialmente descrito en pacientes con LES, el SAF pronto fue reconocido como una entidad independiente y esto condujo a la introducción del término SAF

primario o secundario. El interés de la comunidad científica en ese momento era enorme, sin embargo no había consenso claro para establecer qué pacientes podían ser incluidos en los estudios.

Los criterios originales para la clasificación del SAF (criterios de Sapporo) se publicaron por primera vez en 1999 (Wilson WA *et al*, 1999). Más recientemente se revisaron los criterios de clasificación de Sapporo, y los nuevos se publicaron en 2006, a los que se dio el nombre de criterios de Sydney (Miyakis S *et al*, 2006) (Tabla 4). Estos criterios de clasificación se usan en la práctica clínica como criterios diagnósticos.

TABLA 4: Criterios de Sidney para clasificación del Síndrome Antifosfolípido (Adaptado de Miyakis S, *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295).

CRITERIOS CLÍNICOS
<p><b>1. Trombosis vascular:</b> 1 o más episodios de trombosis arterial, trombosis venosa (TV) o trombosis de pequeño vaso en cualquier tejido u órgano.</p> <p><b>2. Complicaciones del embarazo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 1 o más pérdidas de fetos normales tras la semana 10.</li><li>- 1 o más nacimientos prematuros morfológicamente normales en la semana 34 o más.</li><li>- 3 o más abortos espontáneos, consecutivos, inexplicados antes de la semana 10.</li></ul>
CRITERIOS ANALÍTICOS
<p><b>1. Anticoagulante lúpico</b> en plasma, en dos o más ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas, de acuerdo con las pautas establecidas por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i>)</p> <p><b>2. Anticuerpos anticardiolipina</b> IgG y/o IgM en suero o plasma con títulos medios o altos (&gt;40 GPL o MPL, o &gt; percentil 99), en dos o más ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas, determinados por una prueba de ELISA estandarizada</p> <p><b>3. Anticuerpos anti-β2GP-I</b> IgG y/o IgM en suero o plasma con un título &gt; percentil 99, en dos o más ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas, determinados por una prueba de ELISA estandarizada</p>

GPL: unidades de IgG; MPL: unidades de IgM; β2GPI: β2 glicoproteína I.

Las ventajas de los nuevos criterios de Sydney sobre los criterios de Sapporo son:

- Definen más claramente los puntos de corte para la positividad de aCL IgG e IgM.
- Incorporan los a-β2GP-I en los criterios de laboratorio, los cuales han demostrado tener significado clínico y pronóstico.
- Dividen a los pacientes con SAF según tengan un parámetro de laboratorio positivo o más, ya que ello permite identificar a pacientes de alto riesgo.
- Se ha definido claramente el momento de la determinación de las pruebas de laboratorio con respecto al evento trombótico u obstétrico. Se ha aumentado el intervalo para la determinación de dos resultados positivos hasta 12 semanas para disminuir los resultados falsos positivos, mientras que en los previos era 6 semanas.
- Se han definido los factores de riesgo cardiovascular que condicionan mayor riesgo de trombosis.
- Se hacen recomendaciones para adherirse a guías específicas de manejo de morbilidad obstétrica.
- Se exponen otras situaciones relacionadas con SAF, lo que facilita el diagnóstico diferencial.

Como se ha mencionado previamente, el SAF puede ocurrir como un síndrome primario o también en el contexto de una enfermedad sistémica, en particular el LES. En pacientes con LES se han descrito episodios de trombosis arterial o venosa por SAF hasta en un tercio de los mismos (Petri M, 2000). En una reciente revisión de la cohorte prospectiva multicéntrica europea “*Euro-Phospholipid Project*”, que incluye 1000 casos de SAF, el 53,1% de los pacientes tenía un SAF primario, y el 36,2% era SAF secundario asociado a LES (Cervera R *et al*, 2014). En esta misma serie la TV superficial y profunda fue la manifestación inicial más frecuente (41,3%), seguida de la pérdida fetal precoz antes de la semana 10 (35,4%) y la patología cerebrovascular (30,9%). Otras manifestaciones incluyeron la trombocitopenia (29,6%), *livedo reticularis* (24,1%) y el tromboembolismo pulmonar (14,1%). Otros lugares de posible afectación son la trombosis renal,



hepática, portal, mesentérica, esplénica, o adrenal. El conjunto de lesiones observadas en el riñón recibe el nombre de nefropatía por SAF (NSAF). Así mismo pueden producirse émbolos, dado que un 4% de los pacientes con LES tienen vegetaciones en la mitral o en la aórtica, infarto de miocardio, disfunción valvular o anemia hemolítica autoinmune. Al estudiar por separado los pacientes con LES, en éstos fueron más frecuentes la anemia hemolítica autoinmune, *livedo reticularis*, la epilepsia, la trombosis glomerular y el infarto de miocardio frente al resto de causas de SAF.

Finalmente, cuando el evento oclusivo ocurre en vasos de pequeño calibre como arteriolas, vénulas y capilares se produce el cuadro de microangiopatía (Love PE y Santoro SA, 1990).

El diagnóstico del SAF lamentablemente sólo puede hacerse cuando el evento trombótico o la morbilidad gestacional ya han ocurrido. Pese a la potencial gravedad, cuando la afectación vascular tiene poca repercusión sistémica (como una *livedo reticularis*) o se da en el contexto de otro cuadro sistémico (como una NL), el cuadro puede ser infradiagnosticado. Esto puede tener implicaciones serias, dado el nada desdeñable riesgo de recurrencia, que puede ocurrir hasta en el 33% de los casos, incluso en presencia de tratamiento antitrombótico (Cervera R *et al*, 2014).

### **2.2.1 ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDO: TIPOS**

Como ya se ha comentado, el SAF se define por la presencia de al menos un evento trombótico venoso y/o arterial o morbilidad del embarazo, y la presencia en plasma de AL o al menos un tipo de aPL. La presencia de títulos positivos de aPL se ha observado hasta en el 30-40% de pacientes con LES.

El término aPL refiere en realidad a una heterogénea familia de inmunoglobulinas IgG, IgM,

IgA (o una combinación de estos isotipos), con una especificidad muy amplia que originalmente se pensó que estaban dirigidas contra algunos de los fosfolípidos aniónicos de las membranas celulares tales como la cardiolipina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, y fosfatidilinositol. Con el tiempo y las nuevas evidencias, se ha incluido también otras especificidades entre las que se cuentan otros tipos de fosfolípidos, algunos complejos proteína-fosfolípido e incluso algunos cofactores proteicos sin estar unidos a fosfolípidos (Bertolaccini ML *et al*, 2004).

La clasificación tradicional que los divide en aCL y AL es en realidad artificial, basada en la técnica de detección empleada, y puede ocurrir que un mismo anticuerpo produzca ambas reacciones. Los aCL se detectan por inmunoensayos en fase sólida, ELISA, (McNeil HP *et al*, 1990; Pierangeli SS *et al*, 1993) donde parte del antígeno inmovilizado es cardiolipina, mientras que el AL se detecta por su capacidad de alterar las pruebas funcionales de coagulación utilizadas en laboratorio donde intervienen fosfolípidos tales como el aPTT (*activated partial thromboplastin time* o tiempo de tromboplastina parcial activada) y el dRVVT (*dilute Russell's viper venom time* o ensayo del veneno de la víbora de Rusell diluido). Un ejemplo de anticuerpos que puede presentar ambas actividades es a- $\beta$ 2GP-I. Los principales anticuerpos y antígenos aparecen detallados en la tabla 5.

TABLA 5: Principales anticuerpos detectables en el SAF

ANTICUERPOS	ANTÍGENO	DETECCIÓN
Anticardiolipina	Cardiolipina (y en menor medida otros fosfolípidos aniónicos)	ELISA
Anticoagulante Lúpico	Fosfolípidos usados en los test de coagulación <i>in vitro</i>	Prolonga TTPA
Anti- $\beta$ 2 Glicoproteína-I	$\beta$ 2GP-I activada (unida a fosfolípidos aniónicos o superficies oxidativas)	ELISA
Antiprotrombina	Protrombina unida a plaquetas irradiadas o en complejos con fosfolípidos	ELISA

**2.2.1a. Anticuerpos anticardiolipina:** son anticuerpos que inicialmente se describieron frente a la cardiolipina pero se sabe que pueden reaccionar contra otros fosfolípidos de carga negativa como fosfatidilserina y fosfatidilinositol, o también fosfatidilglicerol, protrombina, anexina V o  $\beta$ 2GP-I (Harris EN *et al*, 1994).

- La cardiolipina (1,3-bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol) o difosfatilglicerol es un lípido que se encuentra de forma exclusiva en la membrana bacteriana o en la membrana mitocondrial interna, donde constituye alrededor del 20% de la composición lipídica de la membrana. También es un componente minoritario de las lipoproteínas del plasma humano aunque es el lípido aniónico más abundante. Posee una estructura dimérica única que contiene unidos cuatro ácidos grasos y posee dos cargas negativas (Brown BS, 1996).
- La fosfatidilserina (abreviado Ptd-L-Ser o PS) es un componente de los fosfolípidos que usualmente se mantiene en la monocapa lipídica interior, en el lado citosólico, de las membranas celulares gracias a una enzima llamada flipasa. Cuando una célula sufre apoptosis, la fosfatidilserina ya no se limita a la parte citosólica de la membrana, sino también queda expuesta a la superficie de la célula y actúa como señal de reconocimiento para la fagocitosis por macrófagos. El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5) $P_2$ ) es uno de los componentes fosfolipídicos de la membrana celular donde es sustrato para un número importante de proteínas de señalización. Este fosfolípido actúa como sustrato de la enzima fosfolipasa C para dar lugar a nuevos fosfolípidos de membrana, que junto con PtdIns(4,5) $P_2$  actúan como fosfolípidos de anclaje que permiten la unión de ligandos, que a su vez promueven el reclutamiento de proteínas a la membrana plasmática y la subsecuente activación y transducción de señales celulares (Brown BS, 1996).
- Los fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos son moléculas lipídicas del grupo de los fosfolípidos. Están compuestos por ácido fosfatídico, una molécula compleja compuesta por glicerol, en el que se han esterificado dos ácidos grasos (uno saturado y otro insaturado) y un grupo fosfato. A su vez, al grupo fosfato se une un alcohol o un aminoalcohol. En los organismos vivos tiene

función estructural puesto que son uno de los principales componentes de las bicapas de las membranas celulares y subcelulares (Brown BS, 1996)

El fosfatidilglicerol posee el alcohol glicerol; si el grupo OH esterifica otra molécula de ácido fosfatídico se origina el difosfatidilglicerol o cardiolipina.

**2.2.1b.** Anticoagulante lúpico: los anticuerpos con actividad AL se dirigen contra diversas proteínas del plasma como, protrombina o anexina V (Passam F y Krilis S, 2004) que están unidas a fosfolípidos aniónicos.

Dado que se describió inicialmente en pacientes con LES (Fenstern DI y Rapaport SI, 1972), el nombre de “anticoagulante lúpico” se debe a que *in vitro* estos anticuerpos bloquean la unión del complejo protrombinasa, dando lugar a una prolongación de los test de coagulación tales como el TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activado), el test de veneno de víbora, el test de kaolina o raramente el tiempo de protrombina. Sin embargo el nombre “anticoagulante lúpico” es una contradicción, ya que la presencia de anticuerpos con actividad AL se asocia *in vivo* a trombosis, no a efecto anticoagulante; además tal y como se ha mencionado anteriormente varios anticuerpos conocidos pueden presentar *in vitro* actividad AL, como son aCL y a- $\beta$ 2GP-I.

Cuando existe un déficit en algún factor de la coagulación, los tiempos de coagulación se corrigen al diluir el suero problema con plasma normal. Si la causa es el AL, la anormalidad no se revierte con plasma normal. La anormalidad se corrige al incubar el suero problema con fosfolípidos, que neutralizan o bloquean la actividad de los anticuerpos (Pengo V *et al*, 2009).

**2.2.1c.** Anticuerpos a- $\beta$ 2GP-I o apolipoproteína H: la  $\beta$ 2GP-I es una apolipoproteína multifuncional. Tiene una estructura formada por una cadena de cuatro dominios (del I al IV) que contienen cada uno dos puentes disulfuro, a la que se une un quinto dominio (dominio V) que contiene un puente disulfuro extra. En condiciones normales la apolipoproteína H inhibe la agregación plaquetaria en el suero y la activación de la cascada de la coagulación al inhibir varios factores de coagulación de la vía intrínseca (Schousboe I, 1985).

En individuos sanos la forma estable de que predomina en plasma se presenta con un puente disulfuro del extremo del dominio I y del dominio V rotos (Figura 2).

Se piensa que los anticuerpos están dirigidos contra epítopes conformacionales de la molécula que se exponen sólo al unirse ésta a fosfolípidos aniónicos (como la cardiolipina) o a superficies oxidadas, como se comentará más adelante. En este contexto en los dominios I y V se crean de nuevo los puentes disulfuro y ello confiere un cambio conformacional a la molécula, el cual llamaremos “forma activada”, que parece favorecer la inmunogenicidad. A grandes rasgos, el reconocimiento de este complejo por autoanticuerpos ejerce diversos efectos sobre la aglutinación plaquetaria y favorece la trombosis (Agar C *et al*, 2010).

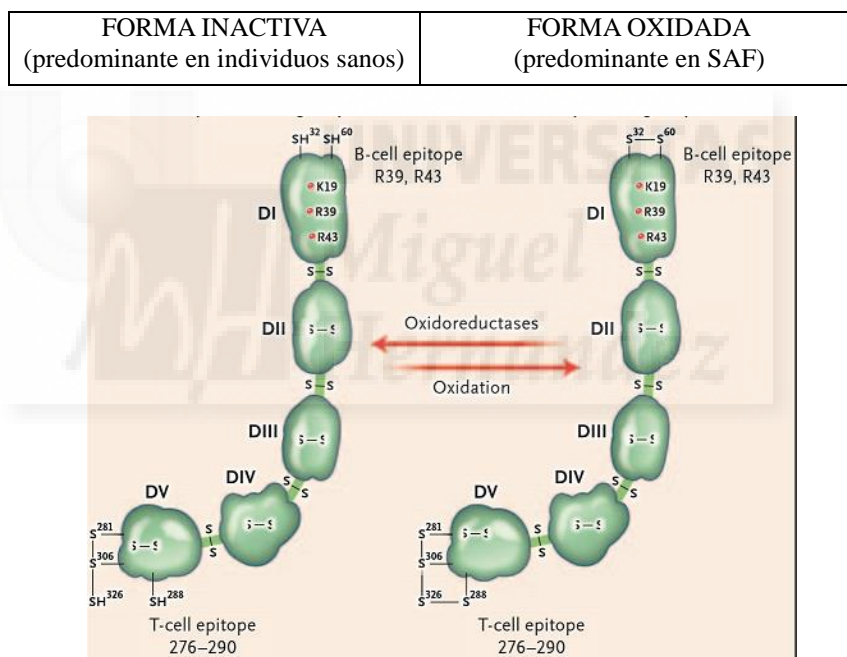


FIGURA 2: estructura de  $\beta$ 2GP-I en plasma. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2013. 14;368:1033-44.

**2.2.1d.** Anticuerpos antiprotrombina: La protrombina es una glicoproteína de cadena simple. Es la principal contribuyente al proceso de coagulación; se activa a trombina por el complejo tenaza formado por el factor Xa y V en presencia de calcio y fosfolípidos. Esta reacción de activación subsecuentemente desata la polimerización del fibrinógeno a fibrina. Los anticuerpos anti-

protrombina se detectan por ELISA utilizando protrombina unida a plaquetas irradiadas, o en complejos con fosfolípidos.

**2.2.1e. Otros autoanticuerpos:** se han descrito otros anticuerpos asociados a clínica de SAF dirigidos específicamente contra, anexina V, fosfatidilserina o fosfatidilinositol (Harris EN *et al*, 1994). En general, los test para detectarlos no están estandarizados para el uso en la práctica habitual. Además, su interpretación y su relevancia clínica no están claramente dilucidados.

## **2.2.2 PAPEL PATOGÉNICO DE LOS**

### **AUTOANTICUERPOS EN EL SÍNDROME**

#### **ANTIFOSFOLÍPIDO**

El mecanismo por el cual estos anticuerpos causan trombosis no es completamente conocido.

Los test para detectarlos han ido evolucionando. Los ensayos ELISA utilizados para aCL y a- $\beta_2$ GP-I no se encuentran totalmente estandarizados, por lo que un gran número de parámetros metodológicos influyen en las discrepancias de los resultados entre los diferentes laboratorios y son el origen de algunos de los resultados aparentemente contradictorios con respecto a la patogenia de los autoanticuerpos del SAF.

Diversos trabajos antiguos señalaron que los a- $\beta_2$ GP-I correlacionaban mejor con el desarrollo de SAF que aCL o AL de forma aislada (Tsutsumi A *et al*, 1996; Cabiedes J *et al*, 1995; Galli M *et al*, 1999). En trabajos más recientes, la positividad de AL se muestra como un importante factor de riesgo para la aparición del primer episodio de trombosis venosa en la población general (de Groot PG *et al*, 2005), así como para ictus en mujeres jóvenes (Urbanus RT *et al*, 2009).

Concretamente en el LES, la presencia de AL también correlaciona mejor con trombosis que la presencia de aCL (Sommers S *et al*, 2002). La positividad de AL ha mostrado ser el factor predictor más importante de trombosis secundarias en el SAF obstétrico (Gris JC *et al*, 2012), a la vez que la positividad de AL se ha mostrado como un factor de riesgo para trombosis y complicaciones del embarazo mayor que la positividad para aCL o a- $\beta$ 2GP-I por separado (Galli M *et al*, 2003; Lockshin MD *et al*, 2012).

Se ha postulado que muy probablemente el riesgo de trombosis es mayor si la positividad de AL es debida a a- $\beta$ 2GP-I que a anticuerpos de otro tipo (de Laat HB *et al*, 2004). Además, se ha observado que en este tipo de pacientes se da una mayor titulación en los niveles de autoanticuerpos contra el dominio I de la molécula  $\beta$ 2GP-I (Iverson GM *et al*, 2002). Por tanto, la presencia de AL del tipo a- $\beta$ 2GP-I dirigidos contra el dominio I son los que parecen conferir el mayor riesgo de trombosis (de Laat B *et al*, 2005). Sin embargo, la triple positividad de aPL (AL, aCL-IgG y a- $\beta$ 2GP-I-IgG) tiene mayor riesgo de trombosis (Tarr T *et al*, 2007) que la presencia de ellos por separado. En un estudio multicéntrico prospectivo de portadores asintomáticos de aPL, el mayor riesgo para el primer evento trombótico se observó en los pacientes con triple positividad para AL, aCL y a- $\beta$ 2GP-I, concretamente portadores del subtipo IgG (Pengo V *et al*, 2011). Por lo tanto lo recomendable es utilizar las pruebas disponibles tanto como para detectar AL como para detectar aPL y a- $\beta$ 2GP-I.

La presencia de anticuerpos antiprotrombina asociados a manifestaciones del SAF se dio a conocer en la década de los 80 (Bajaj SP *et al*, 1983). Hay datos publicados que correlacionan la presencia de estos anticuerpos con AL, y otros no, lo cual parece señalar que hay dos tipos de anticuerpos antiprotrombina, con actividad AL y sin ella. En cualquier caso, la presencia de anticuerpos antiprotrombina se asocia a las manifestaciones clínicas de SAF, incluso cuando los resultados son negativos para los ensayos de aPL convencionales (Bertolaccini ML *et al*, 2005; Sciascia S *et al*, 2014).

Sin embargo pese a la positividad de aPL sólo una parte de los pacientes portadores

desarrollará un evento trombótico y por tanto un SAF establecido. Por tanto es necesario aclarar el resto de mecanismos patogénicos en el SAF.

## **2.2.3 MECANISMOS PATOGENICOS DEL SÍNDROME**

### **ANTIFOSFOLÍPIDO**

Aparentemente, las manifestaciones clínicas que se asocian a SAF son el resultado de una compleja trama de efectos de los anticuerpos sobre distintos momentos de la coagulación. La acción procoagulante de estos anticuerpos se ejerce al actuar sobre la proteína C, la anexina V, las plaquetas, proteasas séricas, receptores *toll-like*, factor tisular y la fibrinólisis (Forastiero R y Martinuzzo M, 2008; Chen PP y Giles I, 2010; Rand JH *et al* 2008; Raschi E *et al* 2008; Kinev AV y Roubey RA, 2008; Bu C *et al*, 2008). Además de aumentar el riesgo de trombosis vascular, los aPL parecen relacionarse con un aumento del tono vascular, condicionando una mayor susceptibilidad a la aterosclerosis, pérdidas fetales y daño neurológico (Mackworth-Young CG, 2004).

La explicación aceptada es que la generación de aPL ocurriría en individuos genéticamente predispuestos tras un factor desencadenante como una exposición accidental a algún agente externo. Los aPL pueden presentarse en el SAF primario o secundariamente en otros escenarios. El caso más común se trata del LES, donde se ha detectado positividad para AL y/o aPL hasta en el 47% de los casos (Sebastiani GD *et al*, 1999; Fangtham M y Petri M, 2013). Sin embargo, pueden presentarse en otros contextos infecciosos (infecciones víricas, bacterianas o parásitos), neoplasias, medicamentos y otras enfermedades de base autoinmune como diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal o anemia perniciosa.

Se ha demostrado que la presencia de aPL por sí misma no es suficiente para inducir trombosis. En modelos animales la inyección de aPL humanos no inició eventos trombóticos; fue necesario



inyectar lipopolisacáridos (de microestructura similar a la de un agente infeccioso/inflamatorio) para iniciar las manifestaciones de SAF (Fischetti F *et al*, 2005). En esta línea, la hipótesis actual con mayor aceptación tiende a considerar que una vez que un estímulo inicial (“*first-hit*”) ha generado aPL, un segundo evento estresante (“*second-hit*”) sería necesario para desarrollar el síndrome completo (Meroni PL *et al*, 2004). Este segundo factor estresante podría ser el tabaco, la inmovilización, el embarazo, el puerperio, el uso de contracepción hormonal, uso de terapia hormonal sustitutiva, neoplasias, HTA, síndrome nefrótico o hiperlipidemia.

Se han formulado varias hipótesis para explicar por qué los aPL producen trombosis, derivadas de experimentos *in vitro*, modelos animales y estudios clínicos en humanos.

#### PAPEL DEL ENDOTELIO VASCULAR

El papel del endotelio vascular en la patogénesis del SAF parece clave. En el modelo patogénico del doble golpe, el “*first-hit*” sería la agresión inicial que en presencia de aPL produce la lesión del endotelio vascular, con activación de células endoteliales, plaquetas y monocitos; el “*second hit*”, mediante mecanismos inflamatorios (activación del complemento y receptores *toll-like*) potenciaría el desarrollo de trombosis en respuesta a un agente externo microbiano o de otra naturaleza (Meroni PL *et al*, 2004).

La capacidad de los aPL de interactuar con las células endoteliales se intuyó al demostrarse que los plasmas con AL+ suprimían la liberación de prostaciclina PGI<sub>2</sub> por el endotelio y alteraban el balance con el tromboxano plaquetario A<sub>2</sub>, favoreciendo un estado procoagulante en el SAF (Carreras LO y Vermynen JG, 1982). Posteriormente distintos estudios mostraron cómo los aPL pueden activar al endotelio de manera dependiente de la presencia de  $\beta$ 2GP-I mediante el incremento en la expresión de las moléculas de adhesión celular y la liberación de citoquinas proinflamatorias (Pierangeli SS *et al*, 1999; Cho CS *et al*, 2002)

Las micropartículas endoteliales son estructuras vesiculares complejas que se liberan por las

células endoteliales activadas apoptóticas. Se componen de una doble membrana fosfolipídica que expone fosfatidilserina, receptores y componentes citosólicos derivados de las células de las que provienen. Estas micropartículas puede inducir la activación de vías para la generación de trombina de distintas maneras. Por un lado, actúan de modo directo a través de una actividad procoagulante intrínseca, al fijar factor tisular (potente iniciador de la vía extrínseca de la coagulación) y favorecer la formación de trombos *in vivo*, pero también de manera indirecta a través de interacciones con monocitos al activar vías dependientes de factor tisular (Sabatier F *et al*, 2002; Abid Husein MN *et al*, 2008).

Pues bien, se ha demostrado que los anticuerpos a- $\beta$ 2GP-I no reaccionan contra un endotelio vascular que no se haya activado (Agostini C *et al*, 2011), aunque el estímulo inicial no pueda ser identificado en muchos casos. El endotelio puede activarse en distintos contextos.

El estrés oxidativo puede favorecer la adhesión al endotelio al estimular la expresión endotelial de anexina A2, que es un receptor de superficie endotelial de  $\beta$ 2GP-I (Madureira PA *et al*, 2011).

Algunos autores han postulado que la alteración del equilibrio redox del medio del endotelio vascular en pacientes predispuestos puede ser el estímulo inicial para desarrollar SAF (Giannakopoulos B y Krilis SA, 2013). Fuentes exógenas, como el tabaco, podrían ocasionar estrés oxidativo sobre el endotelio que promueva el microambiente protrombótico.

Por otro lado, los pacientes con SAF podrían tener un déficit en la actividad de la óxido nítrico-sintetasa endotelial, ya que en estos pacientes se han mostrado unos niveles en plasma de óxido nítrico menores que en pacientes sanos (Ames PR *et al*, 2010). El óxido nítrico y sus metabolitos desempeñan un importante papel en el mantenimiento del medio endotelial, y su déficit ocasiona incremento de radicales superóxido.

Aunque la activación del endotelio vascular se ha mostrado en presencia de diversos tipos de aPL, la activación plaquetaria sólo se ha constatado en los casos con desarrollo de eventos trombóticos (Pierangeli SS y Harris EN, 2003; Jy W *et al* 2007), sugiriendo que además de la activación endotelial la activación plaquetaria sería el siguiente paso clave para el desarrollo de SAF.

### PAPEL DEL COMPLEMENTO

Las fracciones activadas del complemento pueden unirse al endotelio, activarlo y promover la iniciación de la trombosis al interactuar con el receptor endotelial de C5a o directamente a través del complejo de ataque de membrana C5b-9 (Wetsel RA, 1995). En modelos murinos se ha demostrado el papel de la activación de la vía clásica del complemento en la aparición de eventos trombóticos asociados a SAF (Pierangeli SS *et al*, 2005). La activación del complemento por los aPL genera C5a, el cual se une y activa a los neutrófilos, conduciendo a la expresión por parte de éstos de factor tisular (Ritis K *et al* 2006).

Los pacientes con SAF primario muestran niveles de CH50, C3 y C4 menores que los controles. Así mismo presentan un incremento en los niveles de fracciones del complemento, como C3a y C4a, lo que traduce activación del mismo (Oku K *et al*, 2009), de manera que parece existir relación entre la actividad del complemento (contexto inflamatorio en general) y SAF.

En la misma línea, se ha encontrado evidencia de un mayor porcentaje de depósito del complemento en el trofoblasto de placentas de pacientes con aPL frente a controles sanas (Shamonki JM *et al*, 2007).

Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la activación del complemento causa el estado procoagulante o es por el contrario resultado de él.

### PAPEL DE LOS MONOCITOS Y EL FACTOR TISULAR

Los aPL parecen incrementar la expresión en la membrana celular de moléculas pro adhesivas y pro coagulantes como el factor tisular y la anexina2. El factor tisular, localizado en las superficies celulares en la forma inactiva, es el principal iniciador de la vía extrínseca de la coagulación *in vivo* sobre las superficies de los monocitos (Cuadrado MJ *et al*, 1997). Se ha demostrado que los pacientes con SAF expresan en la superficie de los monocitos mayor cantidad de factor tisular y de otras

proteínas con potencial procoagulante, tales como la anexina, *toll-like receptor4* y calreticulina (López-Pedrerera C *et al*, 2008).

#### PAPEL DE LA CONFORMACION DE $\beta$ 2GP-I Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La estructura de  $\beta$ 2GP-I parece tener al menos dos formas. La molécula circulante inactiva se ha sugerido que tiene una estructura circular, mantenida mediante una interacción entre los dominios I y V.

En circunstancias de mayor estrés oxidativo se produce un cambio estructural que conduce a la apertura de la molécula, lo cual expone epítomos del dominio I con capacidad antigénica. Ello permite la formación y la unión de anticuerpos a- $\beta$ 2GP-I. Se ha demostrado que la conformación abierta prolonga el aPTT cuando se añade a plasma normal, que puede aumentar aún más cuando se añaden anticuerpos a- $\beta$ 2GP-I (Agar C *et al* 2010).

En un estudio multicéntrico con suero de más de 600 voluntarios se observó una mayor proporción de formas activadas de  $\beta$ 2GP-I en los pacientes con SAF, frente a pacientes con enfermedades autoinmunes o enfermedades trombóticas pero sin SAF (Ioannou Y *et al*, 2011). En este mismo trabajo, los pacientes con SAF que presentaron positividad doble tanto para AL como para a- $\beta$ 2GP-I tenían una mayor proporción de formas oxidadas activadas de la molécula  $\beta$ 2GP-I que los pacientes que sólo presentaron positividad para a- $\beta$ 2GP-I . Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo induce cambios estructurales en la molécula  $\beta$ 2GP-I que le confieren mayor antigenicidad o capacidad trombogénica.

## **2.2.4 MANIFESTACIONES RENALES DEL SÍNDROME**

### **ANTIFOSFOLÍPIDO**

El riñón es uno de los órganos diana más relevantes en los pacientes con aPL, que puede afectarse por trombosis en cualquier punto a nivel vascular o microvascular: arterias renales, arterias intraparenquimatosas, arteriolas, capilar glomerular y venas renales. Las trombosis pueden ocurrir sobre riñón nativo y también sobre el injerto en pacientes trasplantados. La NSAF es una entidad cuya patogenia no está completamente aclarada pero que tiene consecuencias clínicas variables. Una vez que ocurre la trombosis, pueden conducir a distintas manifestaciones como HTA, hematuria, proteinuria, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica y fracaso renal terminal (Amigo MC, 2006). Se ha descrito una prevalencia variable. En el estudio “*Euro-phospholipid project*” se comunicó una prevalencia de afectación renal de aproximadamente el 3% en el conjunto de SAF (Cervera R *et al*, 2014). Esta prevalencia es mayor en el SAF asociado al LES, pudiendo oscilar entre 10,4% y el 39,5% (Tektonidou MG *et al*, 2004; Miranda JM *et al*, 2009; Cheunsuchon B *et al*, 2007). Sin embargo, la mayor prevalencia de la afectación renal del SAF se ha publicado en el registro internacional de pacientes con SAF catastrófico “*CAPS Registry*”, donde NSAF se manifestó en el 71% de los casos (Cervera R *et al*, 2009).

La presencia confirmada de lesiones vasculares en la biopsia renal supone un factor de riesgo independiente para desarrollar HTA, elevación de creatinina sérica y fibrosis intersticial con peor pronóstico renal. No obstante, la prevalencia de estas complicaciones y su correlación con la presencia de aPL o SAF es variable en los diferentes estudios (Fakhouri F *et al*, 2003; Daugas E *et al*, 2002; Tektonidou MG *et al*, 2004; Cheunsuchon B *et al*, 2007; Cohen D *et al* 2008), aunque parece superior con AL que con aCL (Fakhouri F *et al* 2003).

La clasificación de las lesiones del NSAF y su correlación clinicopatológica depende de la histología, ya que no existen biomarcadores específicos. Por este motivo la clasificación definitiva de las lesiones de NSAF y su prevalencia se han visto limitadas por varios factores. En primer lugar, no es habitual obtener biopsias renales de NSAF en el momento de la trombosis aguda, ya que la clínica inicial puede ser silente o por el contrario si la trombosis es significativa la situación puede ser tan inestable que el procedimiento se contraindique. Tampoco se realiza biopsia en pacientes con SAF ya diagnosticado y anticoagulados. Lo más común es que se realice biopsia en pacientes con LES y actividad renal, en los cuales además de la NL se encuentren lesiones vasculares; con menor frecuencia la biopsia renal se realiza por la sospecha en concreto de SAF primario ante el hallazgo de clínica renal en pacientes en los cuales se ha detectado la presencia de aPL. En segundo lugar, se trata de lesiones relativamente infrecuentes; la sospecha clínica es baja y la sensibilidad de las técnicas histológicas para detectar microtrombos está limitada por la falta de experiencia de los patólogos y el pequeño tamaño de las muestras obtenidas para biopsia. Por último, los cambios vasculares pueden evolucionar tras la trombosis aguda y se han descrito lesiones de NSAF que incluyen lesiones más bien inespecíficas. Las lesiones agudas evidentes son características, pero las lesiones vasculares crónicas pueden confundirse con cambios de arteriosclerosis (Tektonidou MG *et al*, 2004).

La afectación de la arteria renal puede ser uni o bilateral, y puede tratarse de lesiones oclusivas *in situ* o de embolismos procedentes de lesiones más proximales o valvulares. La manifestación clínica habitual de esta lesión consiste en la instauración brusca de HTA grave o de empeoramiento de la HTA preexistente, que a veces puede estar acompañado de dolor en el flanco, hematuria o alteración de la función renal. La obstrucción puede dar lugar a infarto renal, fallo renal agudo isquémico o isquemia crónica con insuficiencia renal progresiva.

La TV renal puede ocurrir en la vena renal o en pequeños vasos intrarrenales. Esta lesión sí se ha asociado específicamente con la presencia de AL, y si la trombosis tiene repercusión puede presentarse como proteinuria en rango nefrótico (Lai NS *et al*, 1997)

Las lesiones más características de NSAF son las intrarrenales. Una de las mejor catalogadas es

la MAT. Histológicamente, la MAT se ha descrito como trombos agudos de fibrina en los glomérulos y/o arteriolas, en ausencia de infiltrado inflamatorio y de depósitos inmunes vasculares. Sin embargo, los trombos de fibrina no son específicos de la NSAF ya que, tal y como se comentó en el apartado de las lesiones vasculares renales, pueden ocurrir en otros contextos como HTA maligna, preeclampsia, toxicidad por ciclosporina, rechazo del trasplante renal, síndrome hemolítico urémico o PTT (Tektonidou MG *et al*, 2004).

Entre las lesiones vasculares intrarrenales de evolución crónica en pacientes con NSAF se han descrito cambios vaso-oclusivos crónicos o fibrosis crónica, e incluyen: arteriosclerosis, hiperplasia fibrosa de la íntima (HFI), tiroidización tubular, oclusiones de arteriolas y atrofia cortical focal (ACF) (Nochy D *et al*, 1999; Asherson RA y Cervera R, 2008). Si se realizan biopsias renales secuenciales se ha observado la progresión de las lesiones agudas a formas crónicas proliferativas, obstructivas y con fibrosis (Tektonidou MG *et al*, 2004).

La arteriosclerosis se caracteriza por un engrosamiento fibroso de la íntima e hialinosis arteriolar que reduce la luz vascular de las arterias interlobulares y arcuatas. La HFI se diferencia del engrosamiento observado por la arteriosclerosis en que la proliferación de miofibroblastos es más intensa. En la HFI la media puede presentar dos patrones distintos: patrón proliferativo con miocitos hipertróficos o patrón con miocitos atróficos y fibrosis. La ACF afecta a zonas superficiales de la corteza subcapsular, asociadas a depresión del contorno de la cápsula renal. En estas áreas de ACF todos los elementos constituyentes del parénquima renal están afectados; los glomérulos pueden verse pequeños y escleróticos o por el contrario pseudoquísticos y voluminosos pero desestructurados. Esta lesión es muy sugerente de NSAF, y conduce a una intensa fibrosis intersticial con tiroidización y atrofia tubular.

La tiroidización tubular se caracteriza por atrofia tubular con depósitos eosinofílicos, simulando tejido tiroideo. Es frecuente que la ACF se asocie a lesiones vasculares de HFI. La IFD puede mostrar fibrina y en ocasiones también depósitos de C3 e IgM en los vasos. Más infrecuentemente se pueden observar depósitos de renina en el aparato yuxtglomerular.

Debe destacarse que tanto en los pacientes con SAF primario como en los pacientes con LES y

aPL/LA existe predisposición para desarrollar trombosis de las venas renales y de la vena cava inferior, asociada a la proteinuria en rango nefrótico.

Finalmente deberá tenerse en cuenta que las lesiones sugerentes de NSAF pueden presentarse independientemente de las lesiones de NL. Los patrones de afectación vascular pueden aparecer asociados o no a los diferentes tipos de GN lúpica (Daugas E *et al*, 2002), sin que haya podido demostrarse la correlación de ninguna lesión vascular con algún tipo histológico específico de la NL.





## 2.3 MARCADORES DE ACTIVACIÓN

### PLAQUETARIA

En el estudio de las lesiones vasculares trombóticas de la NLES ya hemos visto las limitaciones de la histología convencional; sin embargo no existen precedentes conocidos de detección inmunohistoquímica (IHQ) de marcadores específicos de microtrombosis.

Se han realizado estudios de detección IHQ centrados en el rechazo de trasplante cardíaco y renal que muestran pequeños depósitos de microagregados plaquetarios CD61/CD41. Tanto CD61 como CD41 son epítomos de la cadena beta-3 integrina presente en plaquetas e incluso en fragmentos membranosos de plaquetas que pueden detectarse por IHQ en tejidos fijados. Esta técnica ha mostrado una elevada sensibilidad para identificar agregados plaquetarios intravasculares, permitiendo detectar microtrombos desde las fases más iniciales. Por el contrario, no se produce inmunorreactividad en material trombótico envejecido ni en las paredes vasculares. En el rechazo agudo de trasplante renal, CD61 ha mostrado ser una técnica muy sensible para detectar activación plaquetaria intravascular incluso en ausencia de trombos visibles por microscopía (Arbustini E *et al*, 2000; Meehan SM *et al*, 2003; Wierzbicki P *et al*, 2006). En los trabajos sobre rechazo de trasplante cardíaco la cantidad de fibrina disminuye progresivamente conforme aumenta el tamaño del trombo (Arbustini E *et al*, 2000). La fibrina es el único componente de los trombos que puede ser identificada en los trombos murales antiguos incluidos en las lesiones de la íntima. Los trombos recientes reaccionan con anti-CD41, anti-CD61 y anti-fibrina, mientras que los trombos organizados sólo reaccionan con anticuerpos anti-fibrina.

El uso de marcadores plaquetarios CD61+ o CD41+ podría mejorar la sensibilidad para detectar microtrombosis en pacientes con NL. Este sería un paso preliminar para definir mejor la correlación clinicopatológica de la microtrombosis en estos pacientes, y su relación con la presencia de aPL.



## 2.4 MARCADORES DE INFLAMACIÓN ASOCIADOS A MICROTROMBOSIS

Como se ha comentado anteriormente no se conoce exactamente si las lesiones microtrombóticas son consecuencia de la inflamación renal, o si contribuyen de manera independiente al daño renal (Descombes E *et al*, 1997; Nochy D *et al*, 1999; Tektonidou MG *et al*, 2004). Los macrófagos junto con las células dendríticas son la mayor fuente de citoquinas inflamatorias, y su interacción con los linfocitos T residentes puede amplificar la inflamación renal.

El acúmulo de macrófagos en el glomérulo y el intersticio es una de las variables individuales que mejor parece correlacionarse con parámetros clínicos y de actividad renal en pacientes con LES, y es un dato de las GN agresivas en humanos (Yang N *et al*, 1998). El recuento de monocitos en la orina, y los niveles urinarios de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) han mostrado ser biomarcadores útiles en la monitorización de la actividad de la NL (Grandaliano G *et al*, 1996; Wada T *et al*, 1996). En pacientes con formas proliferativas de NL, MCP-1 también puede tener un papel relevante la modulación del infiltrado inflamatorio intersticial y el daño tubulointersticial, a través de la vía del factor TGF- $\beta$  (*transforming growth factor-beta*) (Wagrowska-Danielewicz M *et al*, 2005). Conocer si la presencia de microtrombos en la biopsia renal correlaciona también con el infiltrado macrofágico podría indicar una relación potencial entre el grado de inflamación y las lesiones vasculares de la NL y de la NSAF.

Por otro lado, muchos estudios han mostrado que la activación del complemento puede jugar un papel importante en los eventos trombóticos en presencia de aPL (Girardi G *et al*, 2003; Pierangeli SS *et al*, 2005). Algunos mediadores inflamatorios derivados del complemento o de anafilotoxinas tales como C3a, C4a y C5a aumentan la permeabilidad vascular, activan las plaquetas y los neutrófilos y promueven la liberación de citoquinas con inducción de una inflamación sistémica y activación de la coagulación. Se ha descrito un aumento en la presencia de anafilotoxinas C3a y C4a en el SAF

primario (Distelmaier K *et al*, 2009)

C4d es un producto de la vía clásica de activación del complemento, que se deposita sobre el eritrocito. En pacientes con LES se ha observado un incremento muy específico del depósito de C4d en plaquetas (DeJong A *et al*, 2000). Además en LES, C4d se asocia a la positividad de AL y aCL y al grado de actividad del LES medido por SLEDAI (Navratil JS *et al*, 2006). En los pacientes con NL y afectación vascular se ha publicado un incremento en el depósito de la fracción C4d del complemento en las plaquetas, incluso en ausencia de aPL (Cohen D *et al*, 2008). Por lo tanto, la activación del complemento podría ser el mecanismo común de la inflamación renal y las trombosis en pacientes con NL, con o sin aPL detectables.

Trabajos con modelos murinos han mostrado cómo la presencia de aPL no es capaz de producir trombosis en ausencia de fracciones C3 y C5 del complemento (Pierangeli SS *et al*, 2005). Para la morbilidad gestacional en modelos murinos se ha mostrado que es esencial una activación previa del sistema del complemento en presencia de aPL (Salmon JE *et al*, 2007), y en humanos también podría señalarse una relación entre el depósito de C4d placentario y la morbilidad gestacional en pacientes con LES y SAF (Cohen D *et al*, 2011).

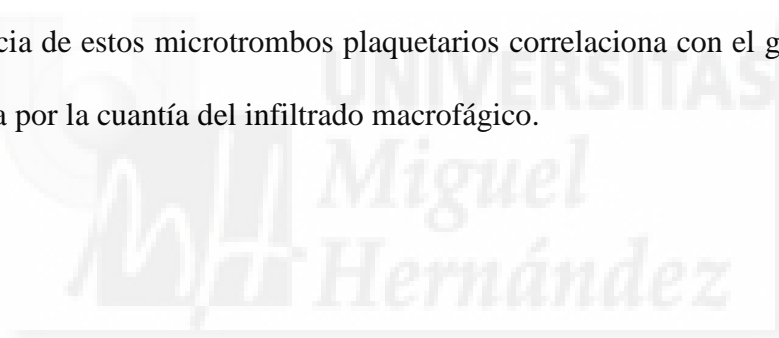
El papel del depósito de C4d en el infiltrado inflamatorio del rechazo al trasplante renal ha sido ampliamente estudiado. En los casos de rechazo humoral se ha observado un mayor depósito de C4d y una activación de los genes responsables de la respuesta inmune; por este motivo en los caso de trasplante renal con deterioro de función renal en que se sospeche rechazo debe realizarse en el momento de la biopsia la tinción IHQ para C4d (Choi J *et al*, 2007; Hayde N *et al*, 2013). Otros autores han encontrado, además, que existe una relación directa entre el grado de depósito de C4d peritubular y el infiltrado inflamatorio glomerular y peritubular (Jin J *et al*, 2015).

Sin embargo, hasta el momento no se ha podido establecer una asociación directa entre el depósito de C4d y las microtrombosis. Tampoco se ha estudiado el depósito de C4d y su relación con el grado de inflamación en la NL. Estudiar la relación entre la actividad del complemento, el infiltrado inflamatorio y la presencia de microtrombos aportaría información sobre la patogenia de las lesiones vasculares de la NL.

### 3. HIPÓTESIS

De acuerdo con todo lo referido anteriormente, planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

- La detección intravascular de microagregados plaquetarios mediante técnicas de IHQ es más sensible que la histología convencional para detectar lesiones trombóticas agudas.
- La presencia de estos microtrombos plaquetarios correlaciona con el grado de inflamación glomerular definida por la cuantía del infiltrado macrofágico.





## 4. OBJETIVOS

En los últimos años se han hecho grandes avances en el estudio de la patogenia y manifestaciones del SAF. Sin embargo, sigue siendo necesario tratar de clasificar mejor las lesiones renales por SAF para definir claramente su significado y repercusión clínica. Poder detectar microtrombos renales con mayor precisión ayudaría a comprender por un lado el marco histológico de la patología vascular renal, y por otro los mecanismos patogénicos subyacentes y su relación con la presencia de aPL. Además adelantaría el diagnóstico de SAF, lo cual tendría repercusiones terapéuticas directas.

En esta línea de investigación, los objetivos de la presente tesis son:

- 1.- Determinar la presencia de microtrombosis renal mediante la expresión IHQ de los marcadores de agregación plaquetaria CD61 y CD41.
- 2.- Estudiar la asociación entre la presencia de estos agregados plaquetarios y los síntomas y signos de afectación renal, así como con los parámetros de función renal y los diferentes tipos de aPL.
- 3.- Analizar la relación entre la presencia de estos agregados plaquetarios con el grado de activación local del complemento, y de la infiltración macrofágica, así como su posible contribución independiente al daño renal en una cohorte de pacientes con LES y NL proliferativa.





# 5. RESUMEN

## DE RESULTADOS



## 5.1 ARTÍCULOS

La metodología y los resultados se aportan en los artículos adjuntos (Anexos 1 y 2)

ARTÍCULO 1 (Anexo 1):

**Immunohistochemical detection of intravascular platelet microthrombi in patients with lupus nephritis and antiphospholipid antibodies.**

María Galindo, Elena Gonzalo, María Paz Martínez-Vidal, Santiago Montes, Natalia Redondo, Begoña Santiago, Estíbaliz Loza, José Luís Pablos.

*Rheumatology 2009, Aug;48(8):1003-7.*

ARTÍCULO 2 (Anexo 2):

**Clinicopathologic correlations of renal microthrombosis and inflammatory markers in proliferative lupus nephritis.**

Elena Gonzalo, Oscar Toldos, María Paz Martínez-Vidal, María Carmen Ordoñez, Begoña Santiago, Antonio Fernández-Nebro, Estíbaliz Loza, Isabel García, Myriam León, José L Pablos and María Galindo.

*Arthritis Research & Therapy 2012, May;28;14(3):R126*

## 5.2 RESUMEN DE RESULTADOS

### 5.2.1 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MICROTROMBOS PLAQUETARIOS EN PACIENTES CON NEFROPATÍA LÚPICA Y aPL

#### ABSTRACT

**Objetivo:** el objetivo de este trabajo fue evaluar si el uso de marcadores plaquetarios inmunohistoquímicos mejoraba la sensibilidad de la histología convencional para detectar microtrombosis en los pacientes con NL y aPL, y analizar las correlaciones clinicopatológicas de la microtrombosis en estos pacientes.

**Métodos:** se incluyeron muestras de biopsia renal de 65 pacientes con LES, incluyendo 36 pacientes con aPL positivos. Se analizó la presencia de agregados plaquetarios detectando la expresión de las glicoproteínas CD61 y CD41 mediante IHQ en los cortes de tejido renal. Se recogieron datos clínicos y analíticos en el momento de la biopsia renal y durante una media de seguimiento de 7,5 años tras la biopsia renal, y se estudió su relación con los hallazgos histológicos o de la tinción IHQ.

**Resultados:** las lesiones histológicas previamente definidas como NSAF se encontraron en el 33% de las biopsias renales de pacientes con LES, y no se halló una asociación con la positividad de aPL. Se detectó la presencia de microtrombos plaquetarios en forma de depósitos plaquetarios intravasculares CD61+ en el 43% de las muestras, asociándose significativamente con la positividad

de aPL. No se encontró asociación de los microtrombos con lesiones histológicas predefinidas de NSAF, manifestaciones de nefropatía ni con el pronóstico renal. Se halló correlación de las lesiones histológicas de NSAF, pero no de los microtrombos CD61+, con mayor edad de los pacientes en el momento de desarrollar la afectación renal, y con la coexistencia previa de factores de riesgo cardiovascular y un peor pronóstico renal.

**Conclusiones:** la inmunodetección de agregados plaquetarios intravasculares CD61+ es más sensible que las técnicas histológicas convencionales para detectar microtrombosis agudas, y aporta mejor correlación con la presencia de aPL en pacientes con LES. Por el contrario, las lesiones histológicas conocidas como NSAF no se asociaron a la presencia de aPL pero sí con los factores de riesgo cardiovascular y un peor pronóstico renal.

## **5.2.2 CORRELACIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE MICROTROMBOSIS RENAL CON MARCADORES DE INFLAMACION EN NEFROPATÍA LÚPICA**

### ABSTRACT

**Introducción:** las microtrombosis pueden observarse con frecuencia en los pacientes con NL, pero su significado clínico se desconoce. Llevamos a cabo un estudio de las correlaciones clinicopatológicas de las microtrombosis renales y los marcadores de inflamación en la NL.

**Métodos:** se analizaron mediante IHQ las biopsias renales de 58 pacientes con LES y nefropatía proliferativa para estudiar la presencia de agregados plaquetarios intravasculares CD61+, infiltración macrofágica CD68+ y depósito de complemento activado C4d. Se analizaron los datos

clínicos en el momento de la biopsia y durante el seguimiento y su asociación con los hallazgos de la IHQ.

**Resultados:** se detectó la presencia de microtrombosis en el 52% de las muestras. De manera significativa, fue más prevalente en los pacientes con positividad de aPL (62% *versus* 42%). La presencia de microtrombosis correlacionó significativamente con un mayor grado de infiltración macrofágica ( $p=0,03$ ). La infiltración macrofágica, pero no las microtrombosis, se asoció de manera significativa con el depósito de C4d. El grado de infiltración macrofágica correlacionó con la actividad de LES y de la NL (proteinuria y sedimento urinario activo), mientras que la presencia de microtrombos CD61+ y el grado de depósito de C4d no correlacionaron con la severidad de la NL ni el pronóstico renal.

**Conclusiones:** la microtrombosis se asocia a una mayor infiltración macrofágica en la NL, pero no parece empeorar de manera independiente el daño renal. La infiltración macrofágica fue el mejor marcador de actividad del LES y de la afectación renal en nuestra serie de pacientes con NL.



## 6. DISCUSIÓN

La detección inmunohistoquímica de los marcadores de agregación plaquetaria, CD61 y CD41, es un método sensible para identificar microagregados plaquetarios intravasculares. El anticuerpo anti-CD61 reconoce la glicoproteína GPIIIa, mientras que el anti-CD41 reconoce GPIIb-IIIa, siendo ambas glicoproteínas componentes de la membrana plasmática plaquetaria. Trabajos centrados en el rechazo de trasplante cardíaco y renal han mostrado mediante tinción IHQ la especificidad de microdepósitos plaquetarios CD41+ y/o CD61+ para detectar la formación de trombos desde los estadios más precoces.

El estudio de la patología en el rechazo al trasplante cardíaco puso de manifiesto la frecuente formación de trombosis oclusiva en los vasos coronarios, pero más característicamente la formación de trombos murales hasta en el 80% de los casos de rechazo (Arbustini E *et al*, 1996).

En el estudio de la composición de esos trombos se llevó a cabo la detección IHQ de marcadores de activación plaquetaria en 75 arterias coronarias de 30 piezas de trasplante cardíaco procedentes de pacientes que habían presentado rechazo al trasplante (Arbustini E *et al*, 2000). Los trombos murales agudos mostraron estar compuestos fundamentalmente por plaquetas con expresión de CD61 y CD41a en su superficie. La tinción IHQ detectó depósitos plaquetarios muy precoces, incluso de una única capa celular adherida a la íntima, que de otra manera no habrían sido detectados por histología convencional. A medida que aumentaba el espesor del trombo mural, aumentaba progresivamente el depósito de fibrina, y a la vez que aparecían los cambios de organización del trombo se observaba una disminución de los marcadores plaquetarios a favor de un aumento del

depósito de anticuerpos antifibrina. Los trombos completamente organizados no mostraron tinción para CD61+ ni CD4a+, y sólo la tinción para fibrina podía testificar la presencia previa de trombo. La tinción CD61+ y CD4a+ se observó, de igual modo, en los trombos oclusivos agudos. Por otro lado se llevó a cabo una tinción con anticuerpos anti-entotelio para identificar áreas de discontinuidad en la integridad de la pared vascular. En general la tinción resultó positiva en todos los segmentos del árbol vascular coronario salvo en aquellos en los que había microdepósitos plaquetarios, lo que tradujo una lesión endotelial coexistente a los microdepósitos plaquetarios.

En el rechazo a trasplante renal se ha descrito la presencia de MAT con una frecuencia variable que oscila entre 4,1% (Pei R *et al*, 1999) y el 49,9% (Lefaucher C *et al*, 2007). Esta amplia variabilidad parece estar en relación con diferencias en la selección de los casos o en los criterios de definición de MAT. Las lesiones de MAT en el rechazo renal se pueden deber a actividad autoinmune (rechazo mediado por anticuerpos) pero también podrían asociarse a toxicidad por inhibidores de la calcineurina, infecciones, HTA maligna o síndrome hemolítico urémico (Chiurchiu C *et al*, 2002). En el estudio del rechazo autoinmune al trasplante renal es a menudo impracticable la detección de anticuerpos específicos del donante, de manera que se han investigado algunos biomarcadores.

Para estudiar la relación entre la patología vascular trombótica y el rechazo agudo a trasplante renal se comparó la presencia de agregados plaquetarios CD61+ murales o intraluminales en biopsias de rechazo humoral agudo frente a biopsias de rechazo celular agudo, toxicidad a inhibidores de calcineurina, MAT o toxicidad tubular aislada (Meehan SM *et al*, 2003). Se confirmaron depósitos CD61+ en el 100% de los trombos glomerulares detectables por histología en pacientes con rechazo humoral agudo, pero también en la toxicidad por calcineurina y los casos de MAT. Lo más destacable fue que se hallaron depósitos CD61+ en ausencia de trombos detectables por histología en el 60% de los casos de rechazo humoral agudo, pero también en el 60% de los casos de toxicidad por calcineurina y en menor medida en el resto de causas. Además, la presencia de CD61+ correlacionó de manera significativa con el grado de capilaritis neutrofílica y de inflamación intersticial. Este trabajo puso de manifiesto la presencia de microtrombos CD61+ en el rechazo renal agudo, pero también en relación con MAT.



Estos dos estudios evidenciaron la relación entre microtrombosis y fenómenos autoinmunes en el rechazo a trasplante, y sirvieron de punto de partida para nuestro trabajo ya que, hasta ese momento, no existía ninguna información sobre la utilidad de detectar mediante IHQ marcadores específicos de microtrombosis en el estudio de las lesiones vasculares en la NL.

En nuestro trabajo se examinaron biopsias de pacientes con NL, y se compararon con controles con MAT sin LES y con controles sanos. Se buscaron cambios histológicos agudos de NSAF, como la MAT, y cambios vasculares crónicos como la HFI la ACF o trombos organizados. En las muestras de MAT sin LES ambos CD61+ y CD41+ se detectaron en vasos tanto glomerulares como extraglomerulares. En contraste, en muestras de riñón sano no se detectaron depósitos intravasculares de CD61 y/o CD41. Al estudiar el conjunto de muestras de riñón patológico (MAT sin LES y NSAF) se observó una tinción CD41+, pero no CD61+, extravascular difusa e inespecífica en el 90% de los casos; esto no ocurrió en las muestras de riñón sano. Dado que la tinción con anti-CD41+ tampoco demostró ser más sensible que anti-CD61+ para detectar trombos intravasculares en las muestras de riñón patológico, se descartó el primero en los experimentos sucesivos.

Mientras que sólo el 32% había sido diagnosticado de NSAF por histología convencional, se detectó la presencia de CD61+ en el 41% de las muestras con NL. Del total de lesiones histológicas de NSAF, CD61+ se detectó sólo en el 54% de los casos, aunque resultó positivo en más de un tercio de pacientes que se habían catalogado sin lesiones histológicas de NSAF.

Nuestros resultados confirman, por tanto, que la detección por IHQ de agregados plaquetarios intravasculares CD61+ tiene mayor sensibilidad para identificar microtrombosis agudas en los pacientes con NL, comparado con los métodos histológicos de rutina. Por el contrario, las lesiones vasculares oclusivas crónicas que en numerosos trabajos previos se han descrito como NSAF, tales como: HFI, trombos organizados, fibrosis arterial o arteriolar o ACF subcapsular fueron negativas para la tinción IHQ CD61+. En nuestra serie todos los pacientes con MAT presentaron algún grado de tinción CD61+. Estos resultados están en la línea de trabajos anteriores, en los cuales el marcador

plaquetario CD61 se detecta más frecuentemente en depósitos agudos de plaquetas, y su frecuencia va disminuyendo a medida que el tiempo pasa y el trombo se organiza con el depósito de fibrina (Arbustini E *et al*, 2000). Es importante destacar que en las muestras de nuestro trabajo no se detectó tinción IHQ CD61+ positiva en vasos normales de riñón sano, y tampoco en estructuras extravasculares de los controles con MAT o NL, lo cual apoya la especificidad de CD61+ como marcador de microtrombosis.

En nuestra serie el 55,4% de los pacientes con NL tenía aPL positivos, lo cual representa una prevalencia superior a la descrita en trabajos previos (Abu Shakra M *et al*, 1996), y la presencia de agregados plaquetarios CD61+ se asoció significativamente con la positividad de estos anticuerpos.

En nuestro trabajo las lesiones histológicas reconocidas como NSAF se asociaron a mayor edad de los pacientes y a la presencia de factores clásicos de riesgo cardiovascular, pero no se asociaron a la presencia de aPL. En cambio, cabe destacar que la presencia de microtrombosis CD61+ sí se asoció significativamente con la presencia de aPL ( $p=0,018$ ), aunque no con lesiones histológicas de NSAF. La mayoría de pacientes con CD61+ tenían títulos positivos de aPL (80%). Tampoco se halló correlación de los microtrombos CD61+ con la edad, factores de riesgo cardiovascular ni el desarrollo de HTA o fracaso renal. Esto sugiere que la detección IHQ de microtrombos plaquetarios intravasculares es un marcador más sensible y específico para el estudio de NSAF que los criterios histológicos utilizados hasta el momento. En dichos criterios histológicos los cambios vasculares asociados a la edad y a factores de riesgo cardiovascular podrían actuar como factores de confusión.

En nuestra muestra no se estudió la presencia de a- $\beta$ 2GP-I, ya que esta prueba diagnóstica no ha estado estandarizada hasta hace pocos años en nuestro medio hospitalario. Dado que la positividad de este tipo de autoanticuerpos correlaciona mejor con las lesiones por NSAF que la detección de aCL o de AL (de Laat HB *et al*, 2004), podría haberse manifestado una asociación distinta entre los hallazgos histológicos y aPL si se hubiera llevado a cabo la detección de a- $\beta$ 2GP-I en nuestra muestra.

En los estudios referidos previamente de rechazo a trasplante cardíaco los anticuerpos antifibrina resultaron de utilidad para detectar los trombos oclusivos organizados, al expresar únicamente fibrina. Sin embargo, en nuestro trabajo, la inmunoreacción usando anticuerpos anti-fibrina dio lugar a un patrón difuso muy inespecífico, que no permitió diferenciar las lesiones vasculares de la fibrosis glomerular o intersticial.

La presencia de lesiones vasculares oclusivas se asocia a peor pronóstico renal. En la segunda parte de nuestro estudio se analizó la potencial relación entre el grado de inflamación y la presencia de microtrombosis renal en pacientes con NL proliferativa. La microtrombosis plaquetaria detectada por IHQ resultó ser una lesión frecuente tanto en vasos glomerulares como extraglomerulares, ya que afectaba a la mitad de los pacientes con formas de NL proliferativas o de mayor actividad a las que se atribuye mayor carga inflamatoria (tipos II, III y IV de la clasificación ISN/RPS). Por el contrario no se evidenció tinción CD61+ en ningún control sano, lo cual plantea la potencial relación entre actividad inflamatoria y trombosis.

Se detectó un mayor depósito de macrófagos CD68+ en las muestras de pacientes con LES que en los controles, tanto a nivel glomerular como extraglomerular, lo que es consistente con trabajos previos que ya habían comunicado un mayor depósito glomerular e intersticial de este tipo celular en los casos de NL tipo IV frente a controles (Wagrowska-Danilewicz M *et al*, 2005).

En cuanto a los parámetros clínicos y de laboratorio, en nuestros pacientes con NL proliferativa el grado de infiltración macrofágica correlacionó con mayor actividad clínica de LES a nivel sistémico y renal, con distinto grado de significación según el lugar del depósito. El infiltrado macrofágico glomerular correlacionó con la actividad medida por SLEDAI (*Systemic Lupus Disease Activity Index*) (Anexo 3) con positividad para a-DNA, hipocomplementemia, proteinuria, microhematuria y presencia de cilindros en el sedimento urinario. El infiltrado extraglomerular parece

tener menor repercusión clínica ya que sólo se asoció con la proteinuria. Estos resultados permiten afirmar una relación directa entre el grado de infiltración por macrófagos y las repercusiones clínicas de la NL. Es destacable que la presencia de microtrombosis correlacionó de manera significativa con una mayor infiltración de macrófagos como marcadores de actividad inflamatoria. A su vez, la presencia de microtrombos se asoció a la presencia de aPL. Sin embargo no se halló relación entre el grado de infiltración macrofágica y la presencia de aPL.

El grado de infiltración por macrófagos constituye, por tanto, el mejor biomarcador histológico de daño renal en el momento de la biopsia, lo cual es consistente con trabajos previos (Hill GS *et al*, 2001).

Aunque se ha comunicado que el infiltrado macrofágico glomerular y extraglomerular persistente tras el tratamiento se asocia a peor desenlace renal a largo plazo (Hills GS *et al*, 2010), en nuestra serie no hemos podido establecer el valor predictivo del grado de infiltrado macrofágico en la primera biopsia para el pronóstico renal a largo plazo. Una posible explicación es el diseño retrospectivo de nuestro trabajo, donde el objetivo fundamental ha sido definir el valor de una nueva forma de detectar la presencia de microtrombos y su correlación transversal con otros datos histológicos y clínicos en el momento de la biopsia, además del escaso número de pacientes incluidos con biopsias consecutivas.

El acúmulo de macrófagos en el glomérulo y el intersticio, además del recuento de monocitos urinarios y sus metabolitos, han mostrado buena correlación con la actividad renal en el LES (Yang N *et al*, 1998; Grandaliano G *et al*, 1996; Wada T *et al*, 1996; Wagrowska-Danilewicz M *et al*, 2005). Sin embargo, es la primera vez que se ha comunicado la relación entre el grado de infiltración macrofágica intrarrenal, la actividad de la NL y la presencia de microtrombos. Nuestros resultados orientan a una relación directa entre inflamación y microtrombosis, y permiten plantear la pregunta de si es necesario contar con una carga inflamatoria determinada para activar los mecanismos patogénicos de la NSAF. Sin embargo desconocemos la relación patogénica exacta entre el infiltrado inflamatorio y el pronóstico renal a largo plazo, ya que hasta el momento no se han comunicado

nuevos datos del grado de infiltración macrofágica renal, la actividad de la NL y lesiones de NSAF.

Aunque la relación de los aPL con las trombosis del SAF está bien establecida, su papel patogénico no está aclarado. Estudios previos sugieren que la activación plaquetaria mediada por complemento en el LES podría *per se* ocasionar microtrombosis, independientemente de la detección positiva o negativa de aPL (Pierangeli SS *et al*, 2005; Navratil JS *et al* 2006; Jy W *et al*, 2007; Cohen D *et al*, 2008).

Los estudios sobre el endotelio vascular sugieren que los aPL pueden en determinadas circunstancias activar las células endoteliales y crear un estado de “hipercoagulabilidad” en los pacientes con SAF. En un segundo paso sería necesaria además la activación plaquetaria (Pierangeli SS y Harris EN, 2003; Jy W *et al* 2007). En ambos mecanismos es clave el papel de complemento.

El depósito lineal capilar peritubular de C4d detectado por tinción IHQ ha mostrado ser un marcador sensible y específico de rechazo renal autoinmune (Collins AB *et al*, 2002; Nickleit V *et al*, 2002; Bohmig GA *et al*, 2002). Para analizar si el depósito de C4d era un factor de riesgo para el desarrollo de MAT en los pacientes con rechazo a trasplante renal se estudiaron más de 1000 biopsias con rechazo de cualquier tipo (Meehan SM *et al*, 2011). Se detectó por histología la presencia de MAT en un bajo número de casos, el 3,4%, y sólo el 0,6% del total presentó lesiones de MAT y positividad para C4d. Los casos que se asociaron MAT y C4d+ fueron en biopsias muy recientes tras el trasplante, en la línea de lo que se ha comunicado anteriormente en series mucho más recortadas (Trpkov K *et al*, 1996; Mauiyyedi S *et al*, 2002). La capilaritis peritubular y la glomerulitis neutrofílica fueron más prevalentes en este pequeño grupo que en el resto, subrayando la posible relación entre la inflamación y la trombosis.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la relación entre activación *in situ* del complemento y la inflamación como mecanismos comunes en la patogenia de las lesiones vasculares asociadas a SAF. Los primeros trabajos en modelos murinos deficientes en los fragmentos C3 y C5

del complemento, mostraron cómo no era posible inducir trombosis al inyectarles aPL tipo IgG de pacientes (Pierangeli SS *et al*, 2005). En ratones con estas fracciones del complemento intactas, al inocularles los aPL humanos se observó un incremento de la activación endotelial (medido mediante una mayor adhesión de leucocitos a la pared) y de las trombosis.

El producto C4d es un derivado de la activación del complemento que se encuentra depositado de manera incrementada en plaquetas de pacientes con LES (Navratil JS *et al*, 2006). Además el depósito plaquetario de C4d se asocia con AL y aCL del tipo IgG e IgM, el grado de actividad del LES medido por SLEDAI y bajos niveles séricos de C4. Por el contrario, los pacientes con LES presentan un incremento en los niveles de fracciones del complemento, como C3a y C4a, lo que traduce activación del mismo (Oku K *et al*, 2009).

Para estudiar el papel etiopatogénico de la activación plaquetaria y de la activación endotelial en el SAF, se analizó la activación plaquetaria medida por micropartículas plaquetarias y la activación endotelial por micropartículas endoteliales en una serie de pacientes con presencia de AL y aPL (aCL y a- $\beta$ 2GP-I) (Jy W *et al*, 2007). Al analizar los casos que presentaron trombosis frente a los que no, se encontraron niveles similares de micropartículas endoteliales, AL y aPL (tanto IgG como IgM). Los pacientes con trombosis tuvieron elevación de micropartículas plaquetarias significativamente mayor al resto, apoyando la hipótesis de que la activación plaquetaria predispondría a la trombosis en presencia de una activación crónica del endotelio.

En concreto en pacientes con NL se ha observado una fuerte relación entre la intensidad del depósito glomerular de C4d y la presencia de microtrombosis, además de con la presencia de a- $\beta$ 2GP-I de tipo IgG (Shen Y *et al*, 2010). Sin embargo ésta podría ser una asociación indirecta ya que ambos procesos, el depósito de C4d y la microtrombosis, pueden asociarse por separado con NL proliferativa y mayores índices de actividad (Distelmaier K *et al*, 2009).

Nuestros datos muestran una asociación entre actividad, infiltrado inflamatorio y la trombosis en la NL, pero son menos claros en lo que respecta a la relación entre activación del complemento y trombosis. Hemos analizado específicamente biopsias de pacientes con formas de NL proliferativas y se ha considerado el infiltrado macrofágico como un marcador adicional de actividad inflamatoria. Nuestros resultados, en contraste con trabajos previos, no muestran una relación directa entre el depósito de C4d y la microtrombosis. En lugar de eso el depósito de C4d correlaciona con la intensidad del infiltrado por macrófagos, el cual a su vez se asoció con microtrombosis. El depósito de C4d en los capilares peritubulares reflejaba actividad renal del LES, de manera paralela a resultados previos (Kim SH y Jeong HJ, 2003; Li SJ *et al*, 2007). Nuestros resultados no encontraron una relación directa entre el grado de depósito de C4d y/o la presencia de microtrombosis con la gravedad de la NL y el pronóstico renal a largo plazo. Es posible que el número de muestras haya sido un elemento limitante en estos resultados.

Las características clínicas previamente descritas como asociadas a NSAF en los pacientes con NL, tales como HTA o peor pronóstico renal, son también más prevalentes en nuestro grupo de pacientes con lesiones histológicas de NSAF, sin embargo no lo son en el grupo de muestras con microtrombos CD61+.

Esta observación, junto a la asociación de aPL con microtrombos CD61+ pero no con los hallazgos microscópicos clásicos de NSAF, parece sugerir que el responsable en parte del peor pronóstico renal atribuido clásicamente a los pacientes con lupus y NSAF podría deberse a una enfermedad vascular crónica de otra etiología distinta a los agregados plaquetarios asociados a la presencia de aPL. Ya se ha establecido previamente que la presencia de factores de riesgo cardiovascular determina un peor pronóstico renal en los pacientes con NL (Clark WF y Moist LM, 1998; Font J *et al*, 2001; Mok CC, 2005), aunque concretamente la correlación entre estos factores y las lesiones trombóticas renales no había sido comunicada por ningún autor en el momento de la realización de este trabajo.

Como hipótesis podría plantearse que los cambios vasculares crónicos ocurrirían en el SAF renal sólo después de la resolución de trombosis de mayor repercusión clínica, lo cual podría explicar su falta de asociación con la presencia de microtrombosis. Sin embargo, nuestros resultados no sustentan este dato ya que no encontramos relación entre la presencia de lesiones histológicas vasculares crónicas y la positividad de aPL. De cualquier modo establecer una relación definitiva puede ser difícil, debido a que los títulos de aPL pueden modificarse a lo largo del curso de la enfermedad.

Este hallazgo, junto con la asociación de estas lesiones crónicas con mayor edad y la existencia de los clásicos factores de riesgo cardiovascular, sugiere que si bien las lesiones crónicas tienen relevancia en el pronóstico renal, son menos específicas para el diagnóstico de NSAF en pacientes con LES y plantean la duda razonable de que las lesiones vasculares crónicas, que no las agudas, deban considerarse como marcador de NSAF. Estudios previos y otros más recientes han abordado el estudio de otros posibles biomarcadores de lesión vascular asociada al SAF.

En el estudio de otros posibles biomarcadores de lesión vascular y de daño inflamatorio, el equipo francés de Nochy trató de definir mejor la estructura y la patogenia de la hiperplasia fibrosa de la íntima en los pacientes con SAF. Para ello utilizaron un anticuerpo monoclonal específico frente a los subtipos de actina  $\alpha$  y  $\gamma$  detectados mediante IHQ (Nochy D *et al*, 1999). Mediante esta técnica pudieron identificar focos en los que la capa íntima estaba engrosada por una proliferación de los miofibroblastos, a diferencia de las lesiones típicas arterioscleróticas.

Más recientemente, se ha publicado otro trabajo en el que se analiza el valor de cuantificar micropartículas endoteliales y plaquetarias por citometría de flujo como marcadores de activación de ambos tipos celulares en pacientes con aCL y a- $\beta$  2GPI positivos. Así los autores demostraron niveles



superiores de micropartículas plaquetarias en aquellos pacientes que desarrollaban trombosis, sugiriendo que más que la activación endotelial, es necesaria la activación plaquetaria para el desarrollo de SAF (Jy W *et al*, 2007).

La proteína C-reactiva (PCR) forma parte de las proteínas expresadas como reactantes de fase aguda en respuesta a la activación de IL-6. Pese a la intensa actividad inflamatoria sistémica en los brotes de LES, las concentraciones séricas de PCR permanecen típicamente bajas (Gaitonde S *et al*, 2008). La PCR tiene un papel modulador controvertido en la activación del complejo de ataque de membrana, pero a suficiente concentración podría prevenir la activación del a vía clásica del complemento (Sjöwall C *et al*, 2007). La presencia de autoanticuerpos contra PCR se describió en el LES por primera vez en 1985 y ha sido confirmada en trabajos posteriores (Robey FA *et al*, 1985; Bell SA *et al*, 1998; Minatami M *et al*, 2001; Shoenfeld Y *et al*, 2007). En los últimos años ha quedado demostrada una fuerte correlación entre los niveles de anti-PCR con la actividad del LES, y que los pacientes con títulos elevados de anti-PCR parecen tener un fenotipo de enfermedad con afectación renal. La positividad de estos anticuerpos parece ser un marcador sensible para establecer el grado de actividad en la NL y la respuesta al tratamiento (Sjöwall C *et al*, 2009).

Muy recientemente se ha estudiado el papel de Syndecan-1 (SDC-1) como biomarcador de actividad en la NL. Se trata de un proteoglicano constituyente de la membrana endotelial cuyo papel es mantener la homeostasis vascular y funciona como un elemento barrera para la filtración glomerular (Mali M *et al*, 1990). Se ha demostrado que los niveles séricos de SDC-1 están aumentados en pacientes con LES frente a pacientes con artritis reumatoide y controles sanos. Los niveles de SDC-1 correlacionaron con la actividad de la enfermedad medida por SLEDAI general y renal, con el título de anti-DNA y con la proteinuria (Kim KJ *et al*, 2015). Aunque estos resultados son prometedores, deben tomarse con cautela ya que los grupos de estudio no eran uniformes.

A pesar del esfuerzo por identificar biomarcadores de lesión vascular con utilidad diagnóstica

y pronóstica en estos pacientes, ninguno de ellos se ha confirmado y validado para su uso estandarizado.

El diseño retrospectivo de nuestro estudio, sin embargo, no permite extraer resultados definitivos en cuanto a las correlaciones clínicas y el pronóstico.

Es posible que la presencia evidente de trombos en la histología tenga un impacto mayor en la función y en el pronóstico renal a corto plazo que los microtrombos detectados por IHQ, pero es un hecho que se trata de una lesión observada infrecuentemente, por los motivos que se han descrito con anterioridad. Por otro lado debe recordarse que CD61+ es un marcador de agregados plaquetarios agudos. Los casos en los que los microdepósitos se reorganicen, en la medida en que las lesiones endoteliales leves sean susceptibles de ser reparadas, probablemente no traducirán cambios histológicos a corto plazo. Se desconoce si las microlesiones repetidas podrían ser responsables de los cambios crónicos de NSAF tales como la HFI o la ACF y si su tratamiento precoz podría evitar complicaciones renales a largo plazo.

Otra limitación de los resultados de este trabajo es la baja prevalencia de las lesiones trombóticas agudas en nuestra serie, comparada con otras series de LES o de SAF, y no hemos podido encontrar una asociación positiva con los agregados plaquetarios CD61+. En la actualidad tampoco está claramente dilucidada la relación entre la actividad autoinmune, la presencia de aPL y la NSAF. Para tratar de confirmar la relación de la patología trombótica con la presencia de aPL u otros factores protrombóticos sería necesario realizar estudios con cohortes más numerosas de pacientes con NL. En este estudio se ha encontrado una escasa correlación entre lesiones vasculares oclusivas crónicas, aPL y depósitos CD61+.

Sería necesario diseñar estudios longitudinales prospectivos con el fin de estudiar biopsias repetidas de pacientes con NLES, antes y después del tratamiento, con el fin de definir mejor estas lesiones microtrombóticas, su relación con el grado de inflamación y sus implicaciones clínicas reales.

Como conclusión principal, nuestros resultados confirman la hipótesis de que la detección intravascular de microagregados plaquetarios mediante técnicas de IHQ es más sensible que la histología convencional para detectar lesiones trombóticas agudas y que la presencia de estos microtrombos plaquetarios correlaciona con el grado de inflamación glomerular definida por la cuantía del infiltrado macrofágico.





## 7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis doctoral son:

- 1.- La microtrombosis renal detectada como trombos plaquetarios CD61+ es altamente prevalente en la NL, afectando hasta la mitad de los casos de formas proliferativas de NL.
- 2.- La detección de microagregados plaquetarios intravasculares CD61+ mediante IHQ es más sensible que la presencia de trombos agudos detectados mediante MO convencional.
- 3.- La microtrombosis es más prevalente en pacientes con aPL. La presencia de microtrombosis correlaciona con la presencia de aPL, y también con una mayor infiltración de macrófagos, como marcadores de actividad inflamatoria y formas más agresivas de NL, aunque no con el depósito de C4d.
- 4.- Las lesiones histológicas vasculares definidas como crónicas se asocian a mayor edad y la existencia de los clásicos factores de riesgo cardiovascular, pero no a la presencia de aPL ni tampoco de microagregados CD61+.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abid Hussein MN, Böing AN, Biró E, Hoek FJ, Vogel GM, Meuleman DG, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res.* 2008;121:865-71.

Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Ritchie S. The significance of anticardiolipin antibodies in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 1996;5:70-3.

Appel G B, Pirani C L, D'Agati V. Renal vascular complications of systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 1994; 4:1499-515.

Ames PR, Batuca JR, Ciampa A, Iannaccone L, Delgado Alves J. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrative stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 2010;37:2523-30.

Amigo MC. Kidney disease in antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 2006;32:509-22.

Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Grasso M, Diegoli M, Fasani R, Pilotto A *et al.* Frequency and characteristics of coronary thrombosis in the epicardial coronary arteries after cardiac transplantation. *Am J Cardiol.* 1996;78:795-800.

Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Gavazzi A, Specchia G, Viganò M. Immunohistochemical characterization of coronary thrombi in allograft vascular disease. *Transplantation.* 2000; 69:1095-101.

Asherson RA, Cervera R. Microvascular and microangiopathic antiphospholipid associated syndromes (“MAMPS”): semantic or antisemantic? *Autoimmun Rev* 2008;7:164-7.

Agar C, van Os GM, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, Derksen RH *et al.* Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2010;116:1336-43.

Austin HA 3rd, Boumpas DT, Vaughan EM, Balow JE. High-risk features of lupus nephritis: importance of race and clinical and histological factors in 166 patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1995; 10:1620-28.

Bajaj SP, Rapaport SI, Fierer DS, Herbst KD, Schwartz DB. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood.* 1983;61:684-92

Balow J E, Austin H A, 3rd. Renal disease in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 1988; 14:117-33.

Banfi G, Bertani T, Boeri V, Faraggiana T, Mazzucco G, Monga G, Sacchi G. Renal vascular lesions as a marker of poor prognosis in patients with lupus nephritis. Gruppo Italiano per lo Studio della Nefrite Lupica (GISNEL). *Am J Kidney Dis.* 1991; 18:240-48.

Bell SA, Faust H, Schmid A, Meurer M. Autoantibodies to C-reactive protein (CRP) and other acute-phase proteins in systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol.* 1998;113:327-32.

Bertolaccini ML, Hughes GR, Khamashta MA. Revisiting antiphospholipid antibodies: from targeting phospholipids to phospholipid binding proteins. *Clin Lab.* 2004;50: 653-65.

Bertolaccini ML, Atsumi T, Koike T, Hughes GR, Khamashta MA. Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems. Prevalence and clinical significance in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost.* 2005;93:289-97.

Bohmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lang U, Kletzmayer J, Säemann MD, *et al.* Capillary C4d deposition in kidney allografts: A specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13: 1091-99.

Bruschi M, Sinico RA, Moroni G, Pratesi F, Migliorini P, Galetti M, Murtas C *et al.* Glomerular Autoimmune Multicomponents of Human Lupus Nephritis In Vivo: alpha-Enolase and Annexin AI. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25:2483-98.

Bu C, Gao L, Xie W, Zhang J, He Y, Cai G, McCrae KR. Beta2-glycoprotein I is a cofactor for tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation. *Arthritis Rheum.* 2009;60:559-68.

Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid



syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti-beta 2-glycoprotein-I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995; 22:1899-906.

Cameron J S. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:413-24.

Cervera R, Bucciarelli S, Plasín MA, Gómez-Puerta JA, Plaza J, Pons-Estel G, Shoenfeld Y *et al*; Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (CAPS) Registry Project Group (European Forum On Antiphospholipid Antibodies). Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): descriptive analysis of a series of 280 patients from the "CAPS Registry". *J Autoimmun*. 2009;32:240-45.

Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Ceberio-Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E, Buonaiuto V, *et al*; on behalf of the Euro-Phospholipid Project Group (European Forum on Antiphospholipid Antibodies). Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:1011-18.

Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2092-94.

Chen PP, Giles I. Antibodies to serine proteases in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12:45-52.

Cheunschon B, Rungkaew P, Chawanasuntorapoj R, Pattaragarn A, Parichatikanond P. Prevalence and clinicopathologic findings of antiphospholipid syndrome nephropathy in Thai systemic lupus erythematosus patients who underwent renal biopsies. *Nephrology* 2007;12:474–80.

Chiurciu C, Ruggenti P, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy in renal transplantation. *Ann Transplant*. 2002;7:28–33.

Cho CS, Cho ML, Chen PP, Min SY, Hwang SY, Park KS, Kim WU *et al*. Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J Immunol*. 2002; 15:168:4209-15.

Choi J, Cho YM, Yang WS, Park TJ, Chang JW, Park SK. Peritubular capillary C4d deposition and renal outcome in post-transplant IgA nephropathy. *Clin Transplant*. 2007; 21:159-65.

Clancy R, Marder G, Martin V, *et al*. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus

erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:1203-08.

Clark WF, Moist LM. Management of chronic renal insufficiency in lupus nephritis: role of proteinuria, hypertension and dyslipidemia in the progression of renal disease. *Lupus* 1998;7:649–53.

Cohen D, Koopmans M, Kremer Hovinga I C, et al. Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:2460-69.

Collins A B, Schneeberger E E, Pascual M A, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Colvin RB. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:2208-14.

Conley CL, Hartman RC. A haemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest,* 1952, **31**: 621–22

Crespo-Leiro M G, Veiga-Barreiro A, Domenech N, et al. Humoral heart rejection (severe allograft dysfunction with no signs of cellular rejection or ischemia): incidence, management, and the value of C4d for diagnosis. *Am J Transplant.* 2005;5:2560-64.

Cuadrado MJ, López-Pedrerá C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A, Hughes GR, Velasco F. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum.* 1997;40:834-41.

Cunard R, Kelly CJ. T cells and minimal change disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1409-11.

Cushman M, Tsai AW, White RH, Heckbert SR, Rosamond WD, Enright P, Folsom AR. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med.* 2004;117:19-25.

Daugas E, Nochy D, Huong D L, et al. Antiphospholipid syndrome nephropathy in systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:42-52.

Day HM, Thiagarajan P, Ahn C, Reveille JD, Tinker KF, Arnett FC. Autoantibodies to beta2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid antibody syndrome: clinical correlations in comparison with other antiphospholipid antibody tests. *J Rheumatol.*

1998;25:667-74.

DeJong A, Ziboh V, Robbins D. Antiphospholipid antibodies and platelets. *Curr Rheum Rep* 2000;2:238-45.

De Kort H, Munivenkatappa RB, Berger SP, Eikmans M, van der Wal A, de Koning EJ, van Kooten C, *et al.* Pancreas allograft biopsies with positive c4d staining and anti-donor antibodies related to worse outcome for patients. *Am J Transplant.* 2010; 10:1660-67.

Descombes E, Droz D, Drouet L, Grünfeld JP, Lesavre P. Renal vascular lesions in lupus nephritis. *Medicine (Baltimore).* 1997; 76:355-68.

Distelmaier K, Adlbrecht C, Jakowitsch J, Winkler S, Dunkler D, Gerner C, Wagner O *et al.* Local complement activation triggers neutrophil recruitment to the site of thrombus formation in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2009; 102:564-72.

El-Banawy HS, Gaber EW, Maharem DA, *et al.* Angiotensin-2, endothelial dysfunction and renal involvement in patients with systemic lupus erythematosus. *J Nephrol.* 2012; 25:541-550.

Erdbruegger U, Woywodt A, Kirsch T, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as a prognostic marker in thrombotic microangiopathy. *Am J Kidney Dis.* 2006; 48:564-70.

Erkan D, Lockshin MD. What is antiphospholipid syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2004;6:451-7.

Esdaile J M, Federgreen W, Quintal H, Suissa S, Hayslett JP, Kashgarian M. Predictors of one year outcome in lupus nephritis: the importance of renal biopsy. *Q J Med.* 1991; 81:907-18.

Fakhouri F, Noel L H, Zuber J, Beaufile H, Martinez F, Lebon P, Papo T *et al.* The expanding spectrum of renal diseases associated with antiphospholipid syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2003; 41:1205-11.

Fangtham M, Petri M. 2013 update: Hopkins lupus cohort. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15:360-66.

Faurschou M, Dreyer L, Kamper A L, Starklint H, Jacobsen S. Long-term mortality and renal outcome in a cohort of 100 patients with lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010; 62:873-80.

Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb.* 1972, **1**:75–95.

Feldman CH, Hiraki LT, Liu J, Fischer MA, Solomon DH, Alarcón GS, Winkelmayr WC, Costenbader KH. Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000-2004. *Arthritis Rheum.* 2013;**65**:753-63.

Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, Bossi F *et al.* Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005;**106**:2340-46.

Font J, Ramos-Casals M, Cervera R, García-Carrasco M, Torras A, Sisó A, Darnell A, Ingelmo M. Cardiovascular risk factors and the long term outcome of lupus nephritis. *Q J Med* 2001;**94**:19–26.

Forastiero R, Martinuzzo M. Prothrombotic mechanisms based on the impairment of fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2008;**17**:872-7.

Fries JW, Mendrick DL, Rennke HG: Determinants of immune complex-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1988;**34**: 333–45.

Gaitonde S, Samols D, Kushner I. C-reactive protein and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008; **15**:59:1814-20.

Galindo M, Gonzalo E, Martinez-Vidal MP, Montes S, Redondo N, Santiago B, Loza E, Pablos JL. Immunohistochemical detection of intravascular platelet microthrombi in patients with lupus nephritis and anti-phospholipid antibodies. *Rheumatology (Oxford).* 2009; **48**:1003-07.

Galli M, Barbui T, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, Zwaal RFA, Bevers EM, Baets MH *et al.* Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *The Lancet* 1990; **335**: 1544–47

Galli M, Finazzi G, Norbis F, Marziali S, Marchioli R, Barbui T. The risk of thrombosis in patients with lupus anticoagulants is predicted by their specific coagulation profile. *Thromb Haemost.* 1999;**81**:695-700.

Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J*

*Med.* 2013;368:1033-44.

Gladman DD, Urowitz MB, Esdaile JM, Han BH, Klippel J, Lahita R, Liang MH *et al.* Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in adults. Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines. *Arthritis Rheum.* 199;42:1785-96.

Gonzalez-Crespo MR, Lopez-Fernandez JI, Usera G, Poveda MJ, Gomez-Reino JJ. Outcome of silent lupus nephritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1996; 26:468-76.

Gonzalo E, Toldos O, Martinez-Vidal MP, Ordoñez MC, Santiago B, Fernández-Nebro A, Loza E, García I, León M, Pablos JL, Galindo M. Clinicopathologic correlations of renal microthrombosis and inflammatory markers in proliferative lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14:R126.

Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis.* 1987;46: 1-6.

Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med.* 1992 Dec 15;117(12):997-1002.

Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, Hollmann TJ, *et al.* Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003, 112:1644-54.

Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, Schena FP: Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment. *J Am Soc Nephrol* 1996, 7:906-13.

Hamasaki K, Mimura T, Kanda H, Kubo K, Setoguchi K, Satoh T, Misaki Y, Yamamoto K. Systemic lupus erythematosus and thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report and literature review. *Clin Rheumatol.* 2003; 22:355-58.

Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, Karpouzas GA *et al.* American College of Rheumatology Guidelines for Screening, Treatment, and Management of Lupus Nephritis. *Arthritis Care & Research* 2012; 64:797-808.

Harris EN, Boey, ML, Mackworth-Young CG, Gharavi AE, Patel BM. Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *The Lancet* 1983; 322: 1211–14

Harris EN, Gharavi A, Asherson RA, Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies—middle aged but robust. *J Rheumatol* 1994;21:978-81.

Hayde N, Bao Y, Pullman J, Ye B, Calder BR, Chung M, Schwartz D *et al.* The clinical and molecular significance of C4d staining patterns in renal allografts. *Transplantation*. 2013;27:580-8.

Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, *et al.* Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest* 2009;119:1286-97.

Hochberg MC. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum*. 1985;28:80-86.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40: 1725

Hu W X, Liu ZZ, Chen HP, Zhang HT, Li LS, Liu ZH. Clinical characteristics and prognosis of diffuse proliferative lupus nephritis with thrombotic microangiopathy. *Lupus*. 2010; 19:1591-98.

Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol*.1986;13: 486–89.

Ioannou Y, Zhang JY, Qi M, Gao L, Qi JC, Yu DM, Lau H *et al.* Novel assays of thrombogenic pathogenicity in the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen  $\beta$ 2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum*. 2011;63:2774-82.

Jain R, Chartash E, Susin M, Furie R. Systemic lupus erythematosus complicated by thrombotic microangiopathy. *Semin Arthritis Rheum* 1994;24:173–82.

Jin J, Li YW, He Q. C4d deposition is associated with immune cells infiltrating in kidney allograft glomerulitis and peritubular capillaritis. *Ren Fail*. 2015 Apr 14:1-7.

Jy W, Tiede M, Bidot CJ, Horstman LL, Jimenez JJ, Chirinos J, Ahn YS. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid

antibodies. *Thromb Res* 2007;121:319–25.

Kant KS, Pollak VE, Weiss MA, Glueck HI, Miller AN, Hess EV. Glomerular thrombosis in systemic lupus erythematosus: prevalence and significance. *Medicine (Baltimore)*. 1981; 60:71-86.

Kim KJ, Kim JY, Baek IW, Kim WU, Cho CS. Elevated serum levels of syndecan-1 are associated with renal involvement in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2015;42:202-9

Kim S H, Jeong H J. Glomerular C4d deposition indicates in situ classic complement pathway activation, but is not a marker for lupus nephritis activity. *Yonsei Med J*. 2003; 44:75-80.

Kinev AV, Roubey RA. Tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2008;17:952-8.

Klemperer P, Pollack A D, Baehr G. Landmark article May 23, 1942: Diffuse collagen disease. Acute disseminated lupus erythematosus and diffuse scleroderma. By Paul Klemperer, Abou D. Pollack and George Baehr. *JAMA*. 1984; 251:1593-94.

Lai NS, Lan JL. Renal vein thrombosis in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1997;56:562-4.

Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP *et al*. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*. 1998;41:778-99.

Lefaucher C, Nochy D, Hill GS, Suberbielle-Boissel C, Antoine C, Charron D, Glotz D.: Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. *Am J Transplant*. 2007; 7: 832–41.

Lo SC, Salem HH, Howard MA, Oldmeadow MJ, Firkin BG. Studies of natural anticoagulant proteins and anticardiolipin antibodies in patients with the lupus anticoagulant. *British Journal of Haematology*. 1990;76 (3),380–386.

Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results . *Clin Exp Immuno*.1985;62: 738–45.



López-Pedrerá C, Cuadrado MJ, Herández V, Buendía P, Aguirre MA, Barbarroja N, Torres LA, *et al.* Proteomic analysis in monocytes of antiphospholipid syndrome patients: deregulation of proteins related to the development of thrombosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2835-44.

López P, Mozo L, Gutiérrez C, Suárez A. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus.* 2003;12:860-5.

Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990;112:682–98.

Mackworth-Young CG. Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin Exp Immunol.* 2004;136:393-401.

Madureira PA, Hill R, Miller VA, Giacomantonio C, Lee PW, Waisman DM. Annexin A2 is a novel cellular redox regulatory protein involved in tumorigenesis. *Oncotarget.* 2011;2:1075-93.

Mali M, Jaakkola P, Arvilommi AM, Jalkanen M. Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 1990, 265: 6884–89

Magro C M, Pope Harman A, Klinger D, Orosz C, Adams P, Waldman J, Knight D *et al.* Use of C4d as a diagnostic adjunct in lung allograft biopsies. *Am J Transplant.* 2003; 3:1143-54.

Mannucci P M, Vanoli M, Forza I, *et al.* Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in 123 patients with connective tissue diseases (systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis). *Haematologica.* 2003; 88:914-18.

Mauyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Tolkoﬀ-Rubin NE *et al.* Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 779–87.

McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA Jr, Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwoh CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1260-70.

McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Rubertone MV, *et al.* The



prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1226-32.

McCluskey RT. Lupus nephritis, in *Kidney Pathology Decennial 1966–1975*.1975; edited by Sommers SC East Norwalk, CT, Appleton-Century-Crofts pp 435–450.

McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .1990;87: 4120–24.

Meehan SM, Limsrichamrern S, Manaligod JR, Junsanto T, Josephson MA, Thistlethwaite JR, Haas M. Platelets and capillary injury in acute humoral rejection of renal allografts. *Hum Pathol*. 2003; 34:533-40.

Meehan SM, Kremer J, Ali FN, Curley J, Marino S, Chang A, Kadambi PV. Thrombotic microangiopathy and peritubular capillary C4d expression in renal allograft biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:395-403.

Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Ventura D, Sarzi Puttini PC, Atzeni F, Lonati L *et al*. Inflammatory response and the endothelium. *Thromb Res*. 2004;114:329-34.

Minatani M, Aotsuka S, Satoh T. Autoantibodies against C-reactive protein (CRP) in sera of patients with systemic rheumatic diseases. *Mod Rheumatol*. 2001 Jun;11:127-31.

Miranda JM, Jara LJ, Calleja C, Saavedra MA, Bustamante RM, Angeles U. Clinical significance of antiphospholipid syndrome nephropathy (APSN) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Reumatol Clin*. 2009;5:209-13.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, *et al*. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4:295-306.

Moore JE, Charles F. Mohr, Ch F. Biologically False Positive Serologic Tests For Syphilis, Incidence, And Cause. *JAMA*. 1952;150:467-73.

Mok C C. Prognostic factors in lupus nephritis. *Lupus*. 2005; 14:39-44.

Musio F, Bohlen EM, Yuan CM, Welch PG. Review of thrombotic thrombocytopenic purpura

in the setting of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1998;28:1-19.

Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. *Thrombosis in Patients with the Lupus Anticoagulant*  
*Ann Intern Med.* 1980;92:156-59.

Navratil JS, Manzi S, Kao AH, Krishnaswami S, Liu CC, Ruffing MJ, Shaw PS *et al.* Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:670-74.

Neil D A, Hubscher S G. Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transpl Int.* 2010; 23:971-83.

Nickeleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: Diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol.* 2002, 13: 242–51.

Nochy D, Daugas E, Droz D, Beaufils H, Grünfeld JP, Piette JC, Bariety J, Hill G. The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:507-18.

Nzerue CM, Hewan-Lowe K, Pierangeli S, Harris EN. "Black swan in the kidney": renal involvement in the antiphospholipid antibody syndrome. *Kidney Int.* 2002; 62:733-74.

Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009 *Jun*;68:1030-35.

Passam F, Krilis S. Laboratory tests for the antiphospholipid syndrome: current concepts. *Pathology* 2004; 36:129-38.

Pei R, Lee J-H, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Human Immunol.* 1999;60: 1293–1302.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and

Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009 Oct;7:1737-40.

Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:145-51

Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation.* 1999; 20;99:1997-2002

Pierangeli SS, Harris EN, Gharavi AE, Goldsmith G, Branch DW, Dean WL. Are immunoglobulins with lupus anticoagulant activity specific for phospholipids?. *British Journal of Haematology.* 1993;85: 124-32

Pierangeli SS, Harris EN. Probing antiphospholipid-mediated thrombosis: the interplay between anticardiolipin antibodies and endothelial cells. *Lupus.* 2003;12:539-45.

Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* 2005 Jul;52:2120-24.

Pollak VE, Pirani CL, Schwartz FD. The natural history of the renal manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med.* 1964;63:537-50.

Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2008;17:922-30

Rapaport SI, Ames SB, Duvall BJ. A plasma coagulation defect in systemic lupus erythematosus arising from hypoprothrombinemia combined with antiprothrombinase activity. *Blood.* 1960;15:212-27.

Raschi E, Borghi MO, Grossi C, Brogгинi V, Pierangeli S, Meroni PL. Toll-like receptors: another player in the pathogenesis of the anti-phospholipid syndrome. *Lupus.* 2008;17:937-42.

Remuzzi G, Bertani T. Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine. *Am J Kidney Dis.* 1989 Apr;13:261-72.

Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, Herzog A, Gerstenbauer G, Konetschny C, Zimmermann K *et al.* ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and

other immunomediated diseases. *Blood*. 2005; 106:1262-67.

Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S *et al*. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol*. 2006;177:4794-802.

Robey FA, Jones KD, Steinberg AD. C-reactive protein mediates the solubilization of nuclear DNA by complement in vitro. *J Exp Med*. 1985;161:1344-56.

Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002; 99: 3962–70.

Salmon J E, Girardi G, Lockshin M D. The antiphospholipid syndrome as a disorder initiated by inflammation: implications for the therapy of pregnant patients. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3:140-47.

Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML1. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost*. 2014;111:354-64.

Sebastiani GD, Galeazzi M, Tincani A, Piette JC, Font J, Allegri F, Mathieu A *et al*. Anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. Prevalence and clinical associations. European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. *Scand J Rheumatol*. 1999;28:344-51.

Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. Demographic differences in the development of lupus nephritis: a retrospective analysis. *Am J Med*. 2002; 112:726-29.

Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196:167.

Shoenfeld Y, Szyper-Kravitz M, Witte T, Doria A, Tsutsumi A, Tatsuya A, Dayer JM, *et al*. Autoantibodies against protective molecules--C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-

binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1108:227-39.

Sjöwall C, Wetterö J, Bengtsson T, Askendal A, Almroth G, Skogh T, Tengvall P. Solid-phase classical complement activation by C-reactive protein (CRP) is inhibited by fluid-phase CRP-C1q interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352:251-58.

Sjöwall C, Zickert A, Skogh T, Wetterö J, Gunnarsson I. Serum levels of autoantibodies against C-reactive protein correlate with renal disease activity and response to therapy in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:188.

Somers E, Magder LS, Petri M. Antiphospholipid antibodies and incidence of venous thrombosis in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29: 2531–36.

Somlo S, Mundel P. Getting a foothold in nephritic syndrome. *Nature Genetics* 2000;24:333-35

Tarr T, Lakos G, Bhattoa HP, Shoenfeld Y, Szegei G, Kiss E. Analysis of risk factors for the development of thrombotic complications in antiphospholipid antibody positive lupus patients. *Lupus.* 2007;16:39-45

Tektonidou M G, Sotsiou F, Nakopoulou L, et al. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:2569-79.

Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor specific antibody. *Transplantation.* 1996; 61: 1586–92.

Tsai H M. Autoimmune thrombotic microangiopathy: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost.* 2012; 38:469-82.

Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K, Fujisaku A, Mukai M, Kobayashi S, Koike T. Antibodies to beta 2-glycoprotein I and clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1466-74.

Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 1999;42:46-50.

Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y *et al.* Monitoring urinary levels of monocyte chemoattractant and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int* 1996, 49:761-67.

Wagrowska-Danilewicz M, Stasikowska O, Danilewicz M: Correlative insights into immunoeexpression of monocyte chemoattractant protein-1, transforming growth factor beta-1 and CD68+ cells in lupus nephritis. *Pol J Pathol* 2005, 56:115-20.

Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:241-50.

Wierzbicki P, Klosowska D, Wyzgal J, Nowaczyk M, Przerwa A, Kniolek M, Górski A. Beta 3 integrin expression on T cells from renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2006; 38:338-39.

Wilson WA, Gharavi AE, Koike Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309–11.

Yang N, Isbel N M, Nikolic-Paterson D J, Li Y, Ye R, Atkins RC, Lan HY. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1998; 54:143-51.

Yao G, Liu ZH, Zheng C, Zhang X, Chen H, Zeng C, Li LS. Evaluation of renal vascular lesions using circulating endothelial cells in patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47:432-36.

Yao GH, Liu ZH, Zhang X, Zheng CX, Chen HP, Zeng CH, Li LS. Circulating thrombomodulin and vascular cell adhesion molecule-1 and renal vascular lesion in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 2008; 17:720-26.

Yung S, Cheung K F, Zhang Q, Chan TM. Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21:1912-27

Zecevic RD, Vojvodic D, Ristic B, Pavlovic MD, Stefanovic D, Karadaglic D. Skin lesions--an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus?. *Lupus*. 2001;10:364-7.







## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO 1





# Immunohistochemical detection of intravascular platelet microthrombi in patients with lupus nephritis and anti-phospholipid antibodies

María Galindo<sup>1,2</sup>, Elena Gonzalo<sup>2</sup>, María P. Martínez-Vidal<sup>1</sup>, Santiago Montes<sup>3</sup>, Natalia Redondo<sup>2</sup>, Begoña Santiago<sup>2</sup>, Estibaliz Loza<sup>4</sup> and José L. Pablos<sup>1,2</sup>

**Objectives.** To evaluate whether the use of platelet immunohistochemistry (IHC) markers improves the sensitivity of histological methods to detect microthrombosis in SLE nephritis and aPLs and to analyse the clinicopathological correlations of microthrombosis in this setting.

**Methods.** Kidney biopsy specimens from 65 patients with SLE, including 36 with positive aPLs, were studied by IHC using antibodies against platelet glycoproteins CD41 and CD61. Clinical data at the time of kidney biopsy and during a mean follow-up of 7.5 years after biopsy were recorded and analysed with regard to histological or IHC data.

**Results.** Histological lesions previously defined as APS nephropathy were found in 33% of the SLE kidney biopsies and were not associated with positive aPLs. Microthrombi detected as intravascular CD61<sup>+</sup> platelet deposits were present in 43% of the tissues and were significantly associated with positive aPLs, but not with histological APS nephropathy, nephritis manifestations nor with renal outcome. Histological APS lesions but not CD61<sup>+</sup> microthrombi correlated with an older age at nephritis presentation, previous cardiovascular risk factors and worse renal outcome.

**Conclusions.** Immunodetection of intravascular CD61<sup>+</sup> platelet aggregates is more sensitive than histological evaluation to detect acute microthrombosis and provides a better correlation with aPLs in SLE patients. In contrast, histological lesions consistent with APS nephropathy were not associated with aPLs but with cardiovascular risk factors and worse renal outcome.

**KEY WORDS:** Anti-cardiolipin antibodies, Anti-phospholipid antibodies, Anti-phospholipid syndrome, Lupus nephritis, Systemic lupus erythematosus.

## Introduction

APS is characterized by a state of hypercoagulability potentially involving all segments of vascular bed with thrombosis and the presence of aPLs, namely aCLs and LAC. APS is classified as primary or secondary when it occurs associated with other disorders, mainly SLE. Positive aPLs are found in 30–40% of the patients with SLE, and arterial or venous thrombosis will develop in nearly one-third of these patients [1, 2].

The kidney is a potential target organ in patients with APS. APS-related renal manifestations may result from thrombosis at any location within the renal vasculature, leading to diverse clinical consequences including severe hypertension, proteinuria, haematuria, nephritic syndrome or renal failure [3]. It is unclear whether non-thrombotic mechanisms can also contribute to the pathogenesis of the APS nephropathy. Renal APS histological lesions are described as acute fibrin thrombi in glomeruli and/or arterioles, defined as thrombotic microangiopathy (TMA), or chronic fibrotic or thrombotic vaso-occlusive lesions [4, 5].

Kidney biopsies are rarely performed in patients with primary APS, whereas they are often obtained from SLE patients with aPLs or secondary APS. APS-related histological lesions may overlap classical lupus nephritis lesions and can be observed in SLE patients without aPLs [6, 7]. Several studies report more frequent hypertension, fibrosis and worse outcomes in patients with lupus nephritis and APS-related kidney lesions, but their prevalence and relationship with aPLs or APS are variable in different studies [8–12]. The classification and clinicopathological correlations of APS kidney lesions are limited by two factors.

On the one hand, the sensitivity of routine histology to detect microthrombosis is limited by its relatively sparse presence and the small size of tissue samples obtained by renal biopsy. On the other hand, previous descriptions of APS nephropathy include acute thrombosis but also less specific chronic vascular lesions such as arteriolar sclerosis or hyalinosis [9].

Immunohistochemistry (IHC) studies focusing on cardiac and renal allograft rejection have shown that small deposits of CD61/CD41<sup>+</sup> platelets can sensitively detect thrombus formation from their earliest phases [13–15]. CD61 and CD41 are epitopes of the  $\beta$ -3 integrin chain present in platelets, microparticles or membrane fragments that are detectable by IHC in formalin-fixed tissues, therefore providing a sensitive method to identify intravascular platelet aggregates. In contrast, in mural layers or old thrombotic material CD61/CD41 immunoreactivity is no longer detectable [13]. In renal acute humoral rejection, CD61 has been very sensitive to detect intracapillary platelet activation in allograft biopsy specimens without light microscopic thrombi [14].

The purpose of this study was to investigate whether the use of CD61/CD41<sup>+</sup> platelet IHC markers may improve our sensitivity to detect microthrombosis in patients with SLE nephritis, and whether they are helpful to better define the clinicopathological correlations of microthrombosis in SLE nephritis patients with or without aPLs.

## Patients and methods

### Patients and kidney biopsies

From a large cohort of SLE patients followed at our Department of Rheumatology between 1986 and 2007, we selected those with available kidney biopsy specimens to perform histological and IHC studies. The study was approved by ethics committee from our institution. This study was performed on previously collected and filed pathology materials obtained after informed patient consent. The use of these materials for the present study was approved by the ethics committee of our institution. All patients

<sup>1</sup>Servicio de Reumatología, <sup>2</sup>Unidad de Investigación, <sup>3</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital 12 de Octubre, Madrid and <sup>4</sup>Fundación Española de Reumatología, Sociedad Española de Reumatología, Madrid, Spain.

Submitted 21 February 2009; revised version accepted 13 May 2009.

Correspondence to: María Galindo, Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba sn, 28041 Madrid, Spain.  
E-mail: mgalindo@h12o.es

fulfilled at least four of the ACR criteria for the diagnosis of SLE [16]. APS was diagnosed according to the Sapporo criteria [17]. Follow-up biopsies from the same patient were also included if available. Kidney biopsies had been performed for diagnostic purposes in patients with proteinuria >500 mg daily, abnormal urinary sediment or elevated serum creatinine level. The following demographic data were recorded: sex, age, age at SLE diagnosis, age at renal disease, time from kidney biopsy to the end of follow-up and death. Clinical and laboratory SLE data, cardiovascular risk factors [high blood pressure (HBP), diabetes, hypercholesterolaemia and/or hypertriglyceridaemia, smoking and hormonal contraception], APS criteria and therapy previous to kidney involvement were recorded. The SLEDAI [18] was calculated when developing lupus nephritis. Renal manifestations at biopsy and at follow-up, specific therapy, response and time to response, relapse and time to relapse were analysed. Renal manifestations included HBP, renal failure defined as serum creatinine  $\geq 0.5$  mg/dl and/or creatinine clearance  $\leq 65$  ml/min, 24-h proteinuria, haematuria, leucocyturia, cellular casts, serum creatinine and creatinine clearance. Complete clinical response to therapy was defined as the presence of 24-h proteinuria <500 mg, normal urine sediment and normal renal function (serum creatinine <1.5 mg/dl and creatinine clearance >75 ml/min). Partial clinical response to treatment was defined when all these parameters improved but not reached complete response criteria. The presence of aPLs (LAC, IgG or IgM aCL) and previous APS criteria prior or after kidney disease were also recorded.

Kidney histology was re-evaluated and classified according to WHO classification [19] by a pathologist who was blinded for clinical and laboratory information. Haematoxylin–eosin and phosphotungstic acid–haematoxylin (PTAH) stained sections were evaluated, and histological lesions previously defined as APS nephropathy specifically analysed. APS nephropathy was diagnosed when at least one of these histological criteria was found: acute lesions (TMA), characterized by the presence of fibrin thrombi in arterioles and/or glomeruli; or chronic lesions such as myofibroblastic intimal cellular proliferation leading to intimal thickening of interlobular arteries or fibrous intimal hyperplasia (FIH), organized thrombi with or without recanalization, fibrous arterial or arteriolar occlusion and subcapsular zone focal cortical atrophy (FCA) [3, 7, 9].

#### *IHC detection of CD61, and CD41 platelet markers*

IHC studies were performed on paraffin-embedded kidney sections. Immunostaining with either anti-glycoprotein (-gp) IIb–IIIa (CD41, sc-6602, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or anti-gpIIIa (CD61, sz21, Immunotech, Marseille, France) was performed. Renal sections from patients with primary TMA were used as positive controls, and sections from normal kidney as negative controls.

Sections were deparaffinized and brought to Tris–phosphate-buffered saline solution (0.15M TBS, pH 7.35). After blocking endogenous peroxidase with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pre-treatment with 10 µg/ml proteinase K (P6556, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), the slides were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. IHC staining was performed with a peroxidase avidin–biotin complex technique (SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Diaminobenzidine was used as chromogen substrate and sections were counterstained with haematoxylin.

#### *Statistical analysis*

The associations between categorical variables were tested using the chi-square or Fisher's exact test, where appropriate. The odds ratios (ORs) with the corresponding 95% CIs were calculated. For continuous variables, the comparisons were carried out using the *t*-test for two independent samples. *P*-values <0.05

were considered significant. The analysis was performed using advanced SPSS software version 11 (SPSS Ibérica, Madrid, Spain).

## **Results**

### *Clinical and laboratory characteristics of SLE patients*

Our series includes 65 patients, 91% women and 9% men, with a mean age of 42 ± 14 years (range 23–92 years). The mean age at SLE diagnosis was 27 ± 13 years (range 6–72 years) and the mean age at kidney biopsy 30 ± 13 years (range 11–73 years). Patients were followed up for a mean time of 89 months (range 1–229 months) after kidney biopsy. Previous cardiovascular risk factors were present in 37 patients (57%). Three patients (5.5%) died, two due to a cardiovascular event and one due to end-stage renal disease.

Thirty-six (55%) patients were aPL-positive and 13 (20%) developed APS: 11 prior to nephritis and 2 during follow-up. APS manifestations included arterial thrombosis (23%), venous thrombosis (69%) and obstetrical complications (8%). Demographic and clinical characteristics of SLE patients included are summarized in Table 1.

Kidney biopsy specimens obtained from these patients were classified according to WHO criteria. Forty-three (66%) had proliferative type III or IV nephritis. Clinical, laboratory and pathology characteristics of our SLE patients at renal biopsy are shown in Table 2.

All but one patient received high doses of steroids ( $\geq 1$  mg/kg/day), in addition to the following immunosuppressive drugs: cyclophosphamide (69%), AZA (9%), mycophenolate mofetil (8%) and chlorambucil (2%). In addition, 47% received aspirin and 8% oral anti-coagulants. Independent of the therapy, 85% responded to treatment and the mean time to response was of 12 months (range 1–101 months). Considering that the patients were homogeneously treated with NIH intravenous cyclophosphamide protocol (20) and high-dose steroids, the rates of complete/partial responses were 32/46% at 6 months and 49/26% at 1 year.

### *Histological and IHC detection of microthrombotic lesions in kidney biopsies*

Seventy-four kidney biopsies from 65 patients were examined. Nine patients had follow-up biopsies. Twenty-four (32%) biopsies showed APS nephropathy according to previously defined histological criteria [3, 9]. The frequency of acute and chronic APS lesions was 8 and 100%, respectively. Specific lesions included TMA (2), FIH (14), FCA (2), recanalizing thrombi (4) and vascular occlusions (18).

Kidney specimens from non-SLE patients with TMA and histologically normal kidney were used as positive or negative controls for IHC. In non-SLE TMA kidney tissues, CD61 and CD41 were invariably detected within intra- or extraglomerular vessels (Fig. 1c and d). In healthy kidney tissues, neither CD61 nor CD41 were detected (Fig. 1a and b). In diseased kidneys (primary TMA controls and SLE nephritis sections), but not in healthy kidneys, extensive non-specific extravascular immunostaining of CD41 but not CD61 was also observed in >90% of the cases (Fig. 1c–h). Since CD41 was not more sensitive than CD61 to detect intravascular thrombi in either control TMA or SLE sections, we selected CD61 intravascular immunostaining for further analyses.

CD61<sup>+</sup> microthrombi were detected in 31/74 (41%) lupus nephritis tissues (27 in glomerular vessels and 20 in extraglomerular vessels). CD61<sup>+</sup> microthrombi were only detected in 13/24 tissues with histological APS lesions (54%), and in 18/49 tissues (37%) without histological APS lesions. All patients with either TMA or FCA, displayed CD61<sup>+</sup> microthrombi, but its prevalence

TABLE 1. Demographic, clinical and laboratory characteristics of SLE patients included

	Patients (n = 65)	CD61 <sup>+</sup> patients (n = 28)	CD61 <sup>-</sup> patients (n = 37)
Sex, F/M	59/6 (91/9)	27/1 (96.4/3.6)	32/5 (86.5/13.5)
Age, mean ± s.d. (range), years	42 ± 14 (23–92)	39 (23–75)	42 (24–92)
Age at SLE diagnosis, mean ± s.d. (range), years	27 ± 13 (6–72)	25 (12–44)	22 (6–72)
Age at nephritis, mean ± s.d. (range), years	30 ± 13 (11–73)	27 (13–45)	26 (11–73)
Duration of follow-up, mean (range), months	88.5 (1–229)	75.7 (6–229)	102.5 (1–227)
Cardiovascular risk factors	37 (56.9)	18/28 (64.3)	21/37 (56.8)
Aspirin	15 (23.1)	7/28 <sup>a</sup> (25)	8/37 <sup>a</sup> (21.6)
Oral anti-coagulation	2 (3.1)	2/28 <sup>a</sup> (7.1)	0
aPL	36 (55.4)	20/28 <sup>a</sup> (71.4)	16/37 <sup>a</sup> (43.2)
APS	11 (16.9)	7/28 <sup>a</sup> (25)	4/37 <sup>a</sup> (10.8)
Arterial thrombosis	3/11 (27.3) <sup>a</sup>	2/28 <sup>a</sup> (7.1)	1/37 <sup>a</sup> (2.7)
Venous thrombosis	7/11 (63.6) <sup>a</sup>	5/28 <sup>a</sup> (17.9)	2/37 <sup>a</sup> (5.4)
Obstetrical pathology, group	1/11 (9) <sup>a</sup>	0	1/37 <sup>a</sup> (2.7)
ANA (+)	65 (100)	28/28 <sup>a</sup> (100)	37/37 <sup>a</sup> (100)
a-DNA (+)	49 (75.4)	23/28 <sup>a</sup> (82.1)	26/37 <sup>a</sup> (70.3)
a-Ro (+)	27 (41.5)	11/28 <sup>a</sup> (39.3)	16/37 <sup>a</sup> (43.2)
a-Sm (+)	19 (29.2)	10/28 <sup>a</sup> (35.7)	9/37 <sup>a</sup> (24.3)
a-RNP (+)	12 (18.5)	7/28 <sup>a</sup> (25)	5/37 <sup>a</sup> (13.5)
Low complement levels	53 (81.5)	25/28 <sup>a</sup> (89.3)	28/37 <sup>a</sup> (75.7)

Values are given as n (%) unless otherwise mentioned. <sup>a</sup>Positive cases/number of patients in the group.

TABLE 2. Clinical and laboratory characteristics of SLE patients at lupus nephritis presentation

	Patients (n = 65)	CD61(+) patients (n = 28)	CD61(-) patients (n = 37)
WHO nephritis classification			
Type I	1 (1.5)	1/28 (3.6) <sup>a</sup>	0
Type II	11 (9)	2/28 (7.1) <sup>a</sup>	9/37 <sup>a</sup> (24.3)
Type III	8 (12.3)	3/28 (10.7) <sup>a</sup>	5/37 <sup>a</sup> (13.5)
Type IV	29 (44.6)	16/28 (57.1) <sup>a</sup>	13/37 <sup>a</sup> (35.1)
Type V	9 (13.8)	3/28 (10.7) <sup>a</sup>	6/37 <sup>a</sup> (16.2)
Types II–V/III–V/IV–V	7 (10.7)	3/28 (10.7) <sup>a</sup>	4/37 <sup>a</sup> (10.8)
24-h proteinuria, mg	3080.11 (0–19 700)	3102 (150–14 000)	3064 (0–19 700)
Haematuria (+)	52 (80)	25/28 (89.3) <sup>a</sup>	27/37 (73) <sup>a</sup>
Cellular casts (+)	43 (66.2)	19/28 (67.9) <sup>a</sup>	24/37 (64.9) <sup>a</sup>
Serum creatinine, mean (range), mg/dl	1.02 (0.4–2.7)	0.97 (0.5–2.1)	1.05 (0.4–2.7)
Creatinine clearance, mean (range), ml/min	89.1 (8–191)	94.76 (27.9–191)	84.89 (8–161)
Renal failure	18 (27.7)	6/28 <sup>a</sup> (21.4)	12/37 <sup>a</sup> (32.4)
HBP	24 (36.9)	13/28 <sup>a</sup> (46.4)	11/37 <sup>a</sup> (29.7)
SLEDAI	20.5 (4–53)	22.6 (7–53)	18.9 (4–32)
Response to treatment	51/60 <sup>a</sup> (85)	23/27 <sup>a</sup> (85.2)	28/33 <sup>a</sup> (84.8)
Time of response, mean (range), months	12 (1–101)	5.8 (1–20)	17.14 (1–101)

<sup>a</sup>Positive cases/number of patients in the group.

was lower in patients with chronic lesions such as vascular occlusions (61%), FIH (36%) and recanalizing thrombi (25%).

Among the nine patients with follow-up biopsies, in six cases histological findings were concordant, five with negative APS nephropathy and one positive. In three patients, APS nephropathy was only found in the second biopsy. In six patients, five without and one with CD61<sup>+</sup> microthrombi, follow-up biopsies were concordant. In three patients, CD61<sup>+</sup> microthrombi were only present in one of the biopsies, two in the first and one in the second biopsy.

#### Clinical and laboratory correlations of histological APS nephropathy or CD41<sup>+</sup> microthrombi

Among patients with histological APS lesions, 43% had positive aPLs and 24% developed APS during follow-up. In patients with CD61<sup>+</sup> microthrombi, aPLs were positive in 80%, and 32% developed APS. The presence of histological APS lesions was not significantly associated with positive aPL nor APS, whereas the presence of CD61<sup>+</sup> microthrombi was significantly associated with positive aCL ( $P=0.018$ ) but not with APS (Table 3).

The presence of histological lesions defined as APS nephropathy was significantly associated with an older age at biopsy ( $P=0.02$ ) and with previous cardiovascular risk factors

( $P=0.006$ ; OR 6.6; 95% CI 1.7, 25.5). On the contrary, the presence of CD61<sup>+</sup> microthrombi was not significantly associated with the age at diagnosis or with previous cardiovascular risk factors. These patients tended to have a higher rate of HBP but the difference was not statistically significant. Neither patient group with APS histological lesions nor those with CD61 microthrombi showed statistically significant differences in other clinical and laboratory data including: delay of kidney biopsy, the presence of proliferative nephritis (WHO subtypes III or IV), HBP, proteinuria, serum creatinine, creatinine clearance, auto-antibodies, low complement levels, renal failure, SLEDAI and the number of SLE diagnosis criteria.

To analyse the potential influence of APS histological lesions or CD61<sup>+</sup> microthrombi in the response to therapy, we only selected those patients with lupus nephritis homogeneously treated with cyclophosphamide according to the NIH protocol ( $n=38$ ). The presence of histological APS lesions correlated with worse renal function at 6 months, 1 year of therapy and at last observation (106 months, range 2–272). At these time points, patients with APS lesions had higher levels of serum creatinine ( $P=0.027$ , 0.04 and 0.005, respectively) and lower creatinine clearance ( $P=0.05$ , 0.002 and 0.036, respectively). A non-significant trend towards higher HBP after 1 year was observed in the group with histological APS lesions. The presence of CD61<sup>+</sup> microthrombi did



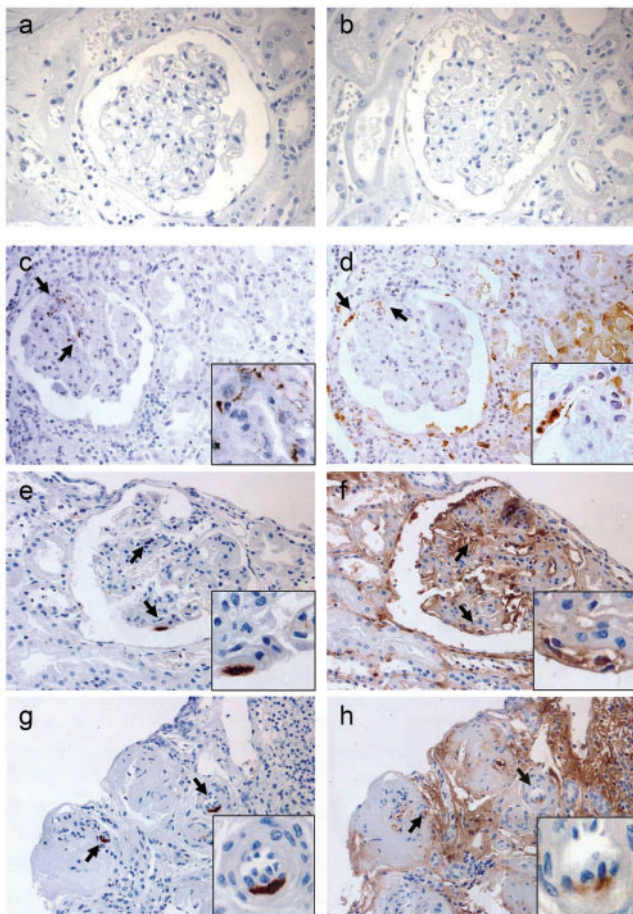


FIG. 1. IHC detection of platelet microthrombi in kidney biopsies. CD61 (left) and CD41 (right) platelet antigens were detected by immunoperoxidase (brown colour, arrows) in serial sections of healthy kidney (a and b), non-SLE TMA (c and d) and SLE nephritis tissues (e–h). SLE glomerular (e and f) or extraglomerular (g and h) microthrombi are shown. Sections were counterstained by haematoxylin. Original magnification:  $\times 400$ . One of the marked areas containing microthrombi is shown in inset with higher magnification.

TABLE 3. Relationship between CD61<sup>+</sup> microthrombi and histological APS lesions and the presence of aPLs

	aPL positive, n (%)	aPL negative, n (%)	P
CD61 <sup>+</sup> microthrombi	20 (80)	5 (20)	$P=0.001$
Histological APS lesions	9 (50)	9 (50)	NS

NS: not significant.

not correlate with the development of HBP nor renal failure at any time point after therapy. Mean levels of proteinuria during follow-up were similar in all groups. Neither APS lesions nor CD61<sup>+</sup> microthrombi correlated with further nephritis relapses.

## Discussion

Our results show that the IHC detection of CD61<sup>+</sup> intravascular platelets is more sensitive to detect acute microthrombi in patients with SLE nephritis compared with routine histological methods. In contrast, histological chronic vascular occlusions previously included as APS-associated kidney lesions were often negative by CD61 IHC. Interestingly, in our series, APS histological lesions were not significantly associated with aPLs but to an older age and to cardiovascular risk factors associated with arteriosclerotic disease. In contrast, CD61-intravascular microthrombi were

significantly associated with aPL and not to ageing or cardiovascular risk factors. This suggests that IHC detection of intravascular platelet microthrombi is a more sensitive and specific marker for aPL-related microthrombi than histological criteria. Anti-CD61 recognizes platelet-specific gpIIIa and in previous studies in cardiac and renal transplants, it was specific for intravascular platelet aggregates that can be recognized with enhanced sensitivity compared with light microscopy [13, 14]. We also did not detect non-specific immunostaining either in normal vessels of healthy kidney control sections, or in extravascular structures of TMA control or SLE kidney sections, confirming the anti-CD61 antibody specificity.

Clinical characteristics previously described in association with APS nephropathy in SLE patients, such as hypertension or worse renal function, are also more prevalent in our patients with histological APS nephropathy but not in the group with CD61-intravascular microthrombi. This observation, together with the association of IHC-detected microthrombi but not histological APS nephropathy to aPL in our series, suggests that non-specific chronic vascular disease rather than aPL-associated microthrombosis might account for the worse renal outcome of SLE-APS nephropathy. The presence of cardiovascular risk factors has been specifically related with a worse renal function prognosis in patients with lupus nephritis [21–23], although its correlation with the presence of vascular occlusions in kidney tissues had not been previously reported.

A potential limitation of these data is the lower prevalence of acute thrombotic lesions in our series, compared with previously reported SLE or APS series [3, 7, 9], which might have contributed to the lack of correlation between APS histological lesions and aPL. Therefore, our data raise doubts on the consideration of chronic but not acute vascular occlusive lesions as histological markers of renal APS. Nevertheless, independently from their physiopathological interpretation, the prognostic significance of chronic lesions is consistent with previous observations. We find similar rates of response to therapy in patients with either histological APS lesions or CD61<sup>+</sup> microthrombi independently of their aPL status. Therefore, aPL was not associated with different clinical or therapeutic outcomes.

In our and other series, the detection of thrombosis in kidney biopsies is not uncommon in aPL-negative SLE nephritis patients [7, 9]. On the other hand, the precise role of aPLs in the development of lupus-related TMA has not been elucidated. Previous reports suggest that immunomediated platelet activation could lead to renal microthrombosis, both in positive or negative aPL patients [11, 24–26]. Therefore, further studies are needed to identify additional risk factors and mechanisms of renal thrombosis in aPL-negative SLE nephritis patients.

In conclusion, IHC detection of the CD61 platelet marker is a sensitive method to identify acute microthrombosis in SLE renal biopsies. Further studies of larger prospective series using this marker will help to confirm its correlation with aPL or additional pro-thrombotic risk factors in SLE nephritis patients as well as its prognostic significance. We found a poor correlation between chronic vascular occlusive lesions, aPLs and CD61 platelet deposits. This observation, together with the association of such lesions with older age and classic cardiovascular risk factors, suggests that these lesions are less specific for secondary renal APS in SLE patients but prognostically relevant.

### Rheumatology key messages

- Immunodetection of intravascular CD61 platelet aggregates is more sensitive than routine histology to detect microthrombosis.
- Immunodetection of microthrombi in SLE kidneys correlates better than histology with aPL.
- Histological vaso-occlusive lesions correlate with cardiovascular risk factors and worse outcomes but not with aPLs.

## Acknowledgement

The authors thank Dr Gabriel Usera for his help in recovering kidney samples and for his valuable suggestions.

**Funding:** This study was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (PI06/90374) and RIER (Red de Inflamación y Enfermedades Reumáticas RD08/0075).

**Disclosure statement:** The authors have declared no conflicts of interest.

## References

- Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990;112:682–98.
- Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:145–51.
- Amigo MC. Kidney disease in antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 2006;32:509–22.
- Nochy D, Daugas E, Droz D *et al.* The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:507–18.
- Asherson RA, Cervera R. Microvascular and microangiopathic antiphospholipid-associated syndromes (“MAMPS”): semantic or antisemantic? *Autoimmun Rev* 2008;7:164–7.
- Jain R, Chartash E, Susin M, Furie R. Systemic lupus erythematosus complicated by thrombotic microangiopathy. *Semin Arthritis Rheum* 1994;24:173–82.
- Hughson MD, Nadasdy T, McCarty GA, Sholer C, Min KW, Silva F. Renal thrombotic microangiopathy in patients with systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *Am J Kidney Dis* 1992;20:150–8.
- Daugas E, Nochy D, Huong du LT *et al.* Antiphospholipid syndrome nephropathy in systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:42–52.
- Tektonidou MG, Sotsiou F, Nakopoulou L, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis Rheum* 2004;50:2569–79.
- Cheunsuchon B, Rungkaew P, Chawanasantorapoj R, Pattaragarn A, Parichatikanond P. Prevalence and clinicopathologic findings of antiphospholipid syndrome nephropathy in Thai systemic lupus erythematosus patients who underwent renal biopsies. *Nephrology* 2007;12:474–80.
- Cohen D, Koopmans M, Kremer Hovinga ICL *et al.* Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2460–9.
- Descombes E, Droz D, Drouet L, Grünfeld JP, Lesavre P. Renal vascular lesions in lupus nephritis. *Medicine* 1997;76:355–68.
- Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Gavazzi A, Specchia G, Viganò M. Immunohistochemical characterization of coronary thrombi in allograft vascular disease. *Transplantation* 2000;69:1095–101.
- Meehan SM, Limsrichamrem S, Manaligod JR *et al.* Platelets and capillary injury in acute humoral rejection of renal allografts. *Hum Pathol* 2003;34:533–40.
- Wierzbicki P, Klosowska D, Wyzgal J *et al.* Beta 3 integrin expression on T cells from renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2006;38:338–9.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271–7.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309–11.
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630–40.
- Antonovych TT, Sabnis SG. Renal manifestations of systemic lupus erythematosus. In: Antonovych TT, ed. *Pathology of systemic lupus erythematosus*. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1995;11–44.
- Austin HA 3rd, Klippel JH, Balow JE *et al.* Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N Engl J Med* 1986;314:614–9.
- Clark WF, Moist LM. Management of chronic renal insufficiency in lupus nephritis: role of proteinuria, hypertension and dyslipidemia in the progression of renal disease. *Lupus* 1998;7:649–53.
- Font J, Ramos-Casals M, Cervera R *et al.* Cardiovascular risk factors and the long term outcome of lupus nephritis. *Q J Med* 2001;94:19–26.
- Mok CC. Prognostic factors in lupus nephritis. *Lupus* 2005;14:39–44.
- Jy W, Tiede M, Bidot CJ *et al.* Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2007;121:319–25.
- Pierangeli SS, Vega-Ostertag M, Liu X, Girardi G. Complement activation: a novel pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:413–20.
- Navratil JS, Manzi S, Kao AH *et al.* Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54:670–4.

## 9.2 ANEXO 2







RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Clinicopathologic correlations of renal microthrombosis and inflammatory markers in proliferative lupus nephritis

Elena Gonzalo<sup>1</sup>, Oscar Toldos<sup>2</sup>, María P Martínez-Vidal<sup>3</sup>, María C Ordoñez<sup>4</sup>, Begoña Santiago<sup>1</sup>, Antonio Fernández-Nebro<sup>4</sup>, Estíbaliz Loza<sup>5</sup>, Isabel García<sup>6</sup>, Myriam León<sup>6</sup>, José L Pablos<sup>1,3†</sup> and María Galindo<sup>1,3\*†</sup>

## Abstract

**Introduction:** Microthrombosis is often observed in lupus nephritis (LN) lesions, but its clinical significance is unknown. We evaluated the clinicopathologic correlations of renal microthrombosis and inflammatory markers in LN.

**Methods:** Kidney biopsies from 58 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) proliferative nephritis were analyzed with immunohistochemistry (IHC) for intravascular platelet aggregates (CD61), macrophagic infiltration (CD68), and activated complement deposition (C4d). Clinical data at the time of kidney biopsy and follow-up were analyzed with regard to pathologic IHC data.

**Results:** Microthrombosis was present in 52% of the tissues. It was significantly more prevalent in patients with antiphospholipid antibodies (aPLs) (62% versus 42%). The presence of microthrombosis significantly correlated with higher macrophagic infiltration. Macrophagic infiltration but not microthrombosis was significantly correlated with C4d deposition. Only macrophagic infiltration showed a correlation with SLE and renal activity (proteinuria and active sediment), whereas neither the presence of CD61<sup>+</sup> microthrombi nor the extent of C4d deposition correlated with LN severity or outcome.

**Conclusions:** Microthrombosis is associated with higher macrophagic infiltration in LN but does not seem to increase independently the severity of renal damage. Macrophagic infiltration was the best marker of SLE and renal activity in this LN series.

## Introduction

Lupus nephritis (LN) develops in 30% to 50% of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) [1]. Standard clinical practice is to perform a renal biopsy if clinical or analytic parameters suggest renal involvement. Although some clinical variables, such as elevation of serum creatinine or persistent elevations of blood pressure, have prognostic value, histologic information obtained from biopsies continues to be indispensable for classification and outcome prediction [2,3]. Among local inflammatory markers, glomerular and interstitial macrophage accumulation is a feature of the most aggressive forms of human

glomerulonephritis [4]. These cells, together with dendritic cells, are the major source of inflammatory cytokines [5], and their interaction with resident T cells may amplify renal inflammation. Monocyte numbers in the urine and urinary levels of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) have been found to be useful markers to monitor the activity of LN [6,7]. In patients with proliferative forms of LN, MCP-1 also may play a role in modulating interstitial inflammatory cell infiltration and tubulointerstitial damage via the transforming growth factor (TGF)-beta 1 pathway [8]. Therefore, glomerular and tubular macrophagic infiltration has important pathogenetic implications, and it is one of the individual variables that best correlates with clinical parameters [9].

Vascular occlusions can be observed in LN and may relate to worse renal outcomes [10]. Acute thrombosis

\* Correspondence: mgalindo@h12o.es

† Contributed equally

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Avenida de Córdoba sn, 28041 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

or chronic occlusive lesions in glomeruli and/or renal arterioles have also been described in patients with antiphospholipid syndrome (APS) [11,12]. Acute thrombosis in LN, as detected with routine histology, is rarely observed, possibly because of its relatively sparse presence and the small size of tissue samples obtained with renal biopsy. Other chronic, nonspecific vascular occlusive histologic lesions may relate to older age and cardiovascular risk factors associated with arteriosclerotic disease, even in patients without aPLs (antiphospholipid antibodies) [13]. This type of chronic occlusive vascular lesions has been associated with a worse renal-function outcome. Immunohistochemical detection of CD61<sup>+</sup> intravascular platelets in SLE renal biopsies increases the sensitivity to detect microthrombosis and reveals a high prevalence of microthrombotic lesions in either aPL-negative or -positive LN patients [13]. Whether microthrombotic lesions are a consequence of renal inflammation or independently contribute to renal damage is unclear [10-12].

A link between activation of the complement system and aPL-induced thrombosis has been described in murine APS models [14,15]. In SLE patients with thrombosis and vascular aPL-related pathology, increased C4d deposition on platelets has been reported [16]. In SLE patients without aPL, C4d kidney deposition also correlates with thrombosis [17]. Therefore, complement activation might be a common mechanism of renal inflammation and thrombosis in patients with LN with or without aPL.

We undertook this study to investigate the potential relation between local complement activation, macrophagic infiltration, and renal microthrombosis, as well as their potential independent contribution to renal damage in a large series of SLE patients with proliferative nephritis. Our data provide evidence of the relation between these three processes but do not support an independent contribution of microthrombosis to renal damage.

## Materials and methods

### Patients and kidney biopsies

From a large cohort of SLE patients followed up at two University Hospitals between 1986 and 2010, we selected those with available kidney biopsy specimens to perform histologic and immunohistochemical studies. All patients fulfilled at least four of the American College of Rheumatology criteria for the diagnosis of SLE [18]. The study received approval by the Ethics Committee of Hospital 12 de Octubre. This study was performed on previously collected and filed pathology materials obtained after informed patient consent. Kidney biopsies had been performed for diagnostic purposes in patients with proteinuria higher than 500 mg/day, abnormal urinary sediment, or elevated serum creatinine level. We considered that

clinicopathologic correlations could be independently analyzed in different episodes, and therefore, biopsies from different episodes of the same patient were included when available. Kidney histology was evaluated and classified according to the ISN/RPS classification [19] by a pathologist who was blinded to patients' clinical and IHC data. Hematoxylin-eosin and phosphotungstic acid-hematoxylin (PAS) stained sections were evaluated. The whole series included 86 patients. In total, 101 histologic samples were analyzed. Among them, we selected 65 (64%) samples with proliferative nephritis (ISN/RPS types II, III, and IV) from 58 patients for further study. Their demographic, clinical, laboratory, and pathology characteristics before and at renal biopsy are detailed in Table 1.

APS was diagnosed according to the Sapporo criteria [20]. Definite APS was considered if at least one of the following clinical and laboratory criteria was satisfied. Clinical criteria included the presence of either vascular thrombosis or pregnancy morbidity. Laboratory criteria included the presence of aPL on two or more occasions at least 6 weeks apart, as demonstrated by one or more of the following: IgG and/or IgM anticardiolipin (aCL) antibodies in moderate or high titer and lupus anticoagulant (LA) activity. LA was detected after updated guidelines of the Subcommittee for the Standardization of Lupus Anticoagulant of the International Society of Thrombosis and Haemostasis [21], whereas aCLs were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by following the manufacturer's instructions (Quanta Lite ACA IgG III and IgM III; Inova Diagnostics Inc, San Diego, CA, USA).

The following demographic data were recorded: sex, age, age at SLE diagnosis, age at renal disease, and time from kidney biopsy to the end of follow-up. Clinical and laboratory SLE data, including the disease-activity index SLEDAI [22], cardiovascular risk factors (high blood pressure (HBP), diabetes, hypercholesterolemia and/or hypertriglyceridemia, smoking, and hormonal contraception), APS criteria, and previous therapy were recorded.

Renal manifestations at biopsy and during the follow-up, specific therapy, response and time to response, and relapse and time to relapse were analyzed. Renal manifestations included HBP, renal failure defined as serum creatinine  $\geq 1.5$  mg/dl and/or creatinine clearance  $\leq 65$  ml/min, 24-hour proteinuria, hematuria, leukocyturia, and cellular casts. Complete clinical response to therapy was defined by 24 hours of proteinuria lower than 500 mg, normal urine sediment, and normal renal function (serum creatinine,  $< 1.5$  mg/dl, and creatinine clearance,  $> 75$  ml/min). Partial response to treatment was defined by improvement in all these parameters not reaching complete-response criteria. The presence of aPL (LA, IgG, or IgM aCL) and APS criteria before and after kidney disease was also recorded.

**Table 1 Demographic, clinical, and laboratory characteristics of SLE patients with proliferative nephritis**

	Patients (n = 58) n (% or range)
Sex: F/M	54/4 (93/7)
Mean age (years)	39 ± 12 (22-75)
Mean age at SLE diagnosis (years)	26 ± 11 (8-66)
Mean age at nephritis (years)	29 ± 12 (8-73)
Mean duration of follow-up (months)	97 (1-273)
Cardiovascular risk factors	35 (58)
Positive aPL	31 (53.4)
APS	8 (14.8)
ANA (+)	58 (100)
a-DNA (+)	49 (84.5)
a-Ro (+)	21 (42.9)
a-Sm (+)	16 (33.3)
a-RNP (+)	11 (22.9)
Low complement levels	52 (91.2)
Treatment before first renal biopsy	
Antiaggregation	20/65 (31)
Oral anticoagulation	2/65 (3.1)
Glucocorticoids	50/65 (77)
≤7.5 mg/d prednisone	42%
< 7.5 to 30 mg/d prednisone	43%
> 30 to 60 mg/d prednisone	10%
> 1 mg/kg/d prednisone	5%
Azathioprine	13/65 (20)
Antimalarials	20/65 (31)
ISN/RPS nephritis classification:	
Type II	2/65 (3)
Type III-A	13/65 (20)
Type III-A/C	4/65 (6.1)
Type III-A + V	2/65 (3)
Type IV-SA	10/65 (15.4)
Type IV-SA/C	4/65 (6.1)
Type IV-GA	23/65 (35.4)
Type IV-GA/C	5/65 (7.7)
Type IV-GA/C + V	2/65 (3)
24 hours proteinuria (mg) <sup>a</sup>	3,355.1 ± 3,372.3 (230-19,700)
Hematuria (+) <sup>a</sup>	56 (86.2)
Leukocyturia (+) <sup>a</sup>	52 (80)
Cellular casts (+) <sup>a</sup>	42 (64.6)
Mean serum creatinine (mg/dl) <sup>a</sup>	1.1 ± 0.5 (0.4-3.4)
Mean creatinine clearance (ml/min) <sup>a</sup>	91.8 ± 44.4 (25-289)
Renal failure <sup>a</sup>	17 (26.2)
HBP <sup>a</sup>	35 (53.8)
SLEDAI <sup>a</sup>	20.4 (4-36)
Response to treatment	50 (83.3)
Mean time of response (months)	15 ± 19 (1-101)

Cardiovascular risk factors include high blood pressure (HBP), diabetes, hypercholesterolemia and/or hypertriglyceridemia, smoking, and hormonal contraception. <sup>a</sup>Values at renal biopsy.

### Immunohistochemical detection of CD61-positive platelet microthrombi, CD68-positive macrophages, and activated complement factor C4d

Immunohistochemical studies were performed on paraffin-embedded kidney sections. Immunostaining with either monoclonal mouse anti-human CD68 (CD68, clone KP1; DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark), monoclonal mouse anti-human gpIIIa (CD61, sz21; Immunotech, Marseille, France), or polyclonal rabbit anti-human C4d (C4dpAb; Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Vienna, Austria) were performed. Renal sections from patients with primary thrombotic microangiopathy (TMA) were used as positive controls for CD61. Renal sections from a normal kidney were used as negative controls.

Sections were deparaffinized and pretreated with 10 µg/ml proteinase K (P6556; Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain) in the case of CD61 detection, or boiled in 1 mM EDTA or citrate buffer 10 mM, pH 6, for CD68 and C4d detection, respectively. The slides were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Immunohistochemical staining was performed with a peroxidase avidin-biotin complex technique (SK-4100; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Diaminobenzidine was used as chromogen substrate, and sections were counterstained with hematoxylin.

Glomerular and extraglomerular CD68 and C4d staining was quantified by using the public domain image-processing program, Image J software [23]. In brief, the percentage of stained area in 10 glomeruli and 10 extraglomerular areas randomly selected from each sample was calculated. Two blinded and independent observers analyzed all slides.

### Statistical analysis

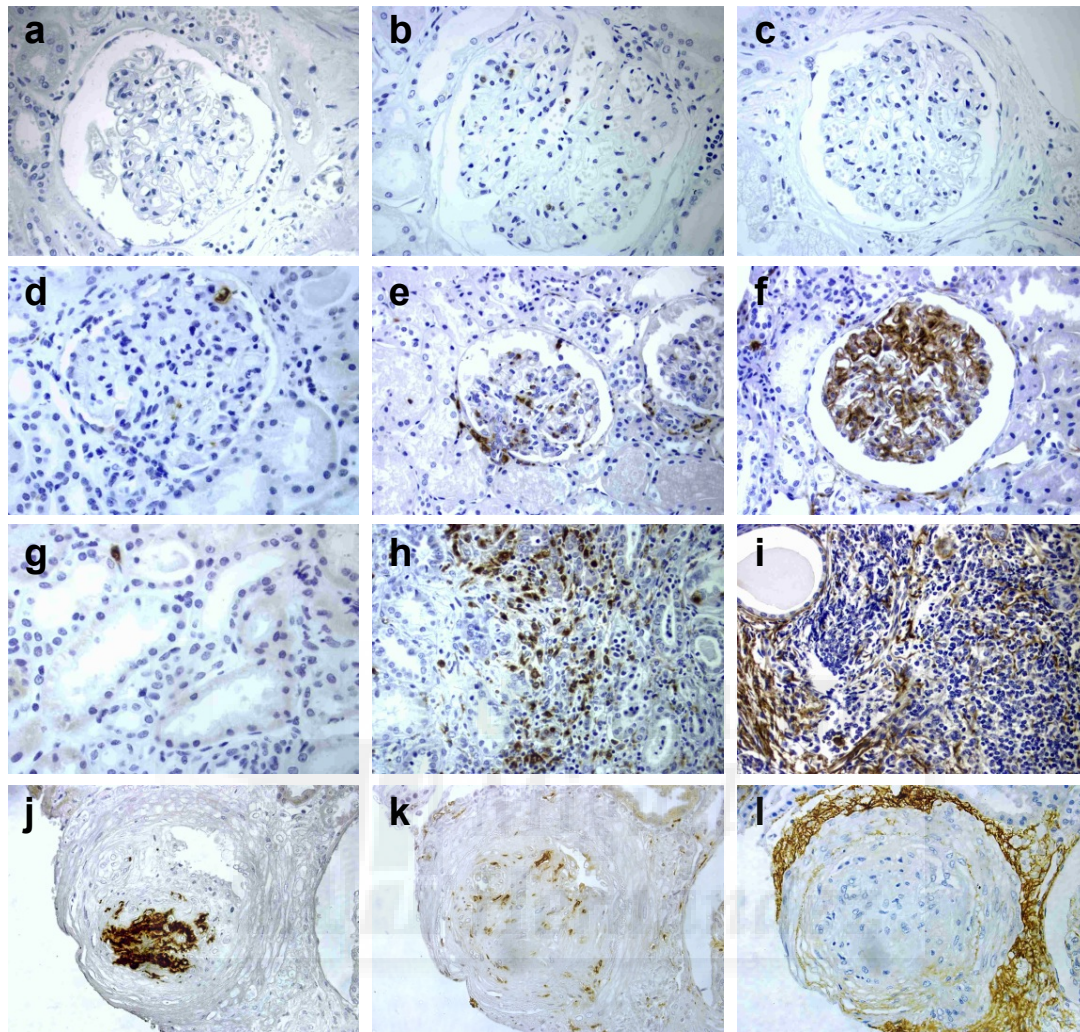
The associations between categorical variables were tested by using the  $\chi^2$  or Fisher Exact test, where appropriate. The odds ratios (ORs) with the corresponding 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated. For continuous variables, the comparisons were carried out by using the *t* test for two independent samples. A Spearman rank correlation was used to detect correlations among different study parameters. *P* values less than 0.05 were considered significant. The analysis was performed by using advanced SPSS software version 15.

### Results

#### Histologic and IHC detection of microthrombotic lesions, macrophagic infiltration, and C4d deposition in kidney biopsies

In healthy, histologically normal kidney sections used as controls for IHC, CD61-positive platelet aggregates were not detected (Figure 1a). CD61-positive microthrombi were detected in 52% of the proliferative LN tissues





**Figure 1 Immunohistochemical detection of platelet microthrombi lesions, macrophagic infiltration, and activated complement deposition in kidney biopsies.** CD61 (left), CD68 (middle), and C4d (right) antigens were detected with immunoperoxidase (brown) in serial sections of healthy kidney (a through c) and SLE nephritis tissues (d through l). SLE glomerular (d through f) or extraglomerular (g through i) markers are shown. Positive CD61 microthrombi (j), CD68 infiltration (k), and C4d perivascular deposition (l) were detected. Sections were counterstained with hematoxylin. Original magnification,  $\times 400$ .

(79% in glomerular and 62% in extraglomerular vessels) (Figure 1d, g, j).

CD68-positive macrophages were identified in the mesangial areas of both normal (Figure 1b) and lupus glomeruli (Figure 1e), as well as in extraglomerular areas (Figure 1h). The density of CD68-positive macrophages in both glomerular and extraglomerular areas was greatly increased in lupus patients. The mean stained area was  $2.37\% \pm 3.02\%$  and  $0.72\% \pm 0.98\%$  in glomerular and extraglomerular regions of lupus sections, respectively, compared with  $0.0004\% \pm 0.0005\%$  and  $0.0003\% \pm 0.0007\%$  in normal kidney.

C4d deposition was undetectable in normal kidney sections (Figure 1c), whereas it was detected in most

SLE biopsies, in either glomerular (78%) or extraglomerular (86%) regions (Figure 1f, i). The mean C4d-stained glomerular and extraglomerular areas were  $2.76\% \pm 3.73\%$  and  $1.04\% \pm 1.32\%$ , respectively. The main extraglomerular pattern was diffuse linear C4d deposition along peritubular capillaries (98%), although some focal arteriolar C4d staining was also found in interstitial vessels (19%) (Figure 1l).

**Clinical and laboratory correlations of platelet aggregates, macrophage infiltration, and C4d deposition**  
Patients with glomerular CD61-positive microthrombi had significantly higher glomerular ( $P = 0.03$ ) macrophage infiltration. C4d extraglomerular deposition

positively correlated with extraglomerular macrophage infiltration ( $r = 0.4$ ;  $P = 0.004$ ), but mean C4d deposition was similar in patients with or without CD61-positive microthrombi.

The presence of platelet aggregates was significantly higher in patients with positive aPL (62% versus 42%; OR, 4.4; CI, 1.5 to 12.8;  $P = 0.005$ ), but it was similar in patient groups with or without definite APS or with or without previous cardiovascular risk factors. No correlations were found between microthrombosis and SLE or renal clinical data, including positive anti-dsDNA antibodies, low complement levels, SLEDAI, 24-hour proteinuria, serum creatinine, creatinine clearance, or the presence of hematuria, leukocyturia, cellular casts, HBP, or renal failure.

Both glomerular and extraglomerular macrophagic infiltrations positively correlated with SLE manifestations. Glomerular macrophagic infiltration correlated with SLEDAI ( $r = 0.5$ ;  $P < 0.001$ ) and was significantly higher in patients with positive anti-dsDNA antibodies ( $P < 0.001$ ) or low complement levels ( $P < 0.001$ ) at biopsy. Regarding renal manifestations, glomerular macrophagic infiltration positively correlated with 24-hour proteinuria ( $r = 0.4$ ;  $P = 0.002$ ) and was associated with the presence of microhematuria ( $P < 0.001$ ), and cellular casts ( $P = 0.001$ ). Extraglomerular macrophage infiltration correlated with SLEDAI ( $r = 0.3$ ;  $P = 0.01$ ) but was not associated with the presence of anti-dsDNA antibodies or low complement levels. Regarding renal manifestations, extraglomerular macrophage infiltration correlated with 24-hour proteinuria ( $r = 0.4$ ;  $P = 0.001$ ) but not with other analytic parameters. No correlation was found between glomerular or extraglomerular macrophage infiltration and renal function defined by creatinine clearance at biopsy.

Extraglomerular C4d deposition was significantly higher in patients with positive anti-dsDNA antibodies ( $P = 0.01$ ) and correlated with SLEDAI ( $r = 0.4$ ;  $P = 0.003$ ) and 24-hour proteinuria ( $r = 0.3$ ;  $P = 0.03$ ). No differences in extraglomerular C4d deposition were found when we considered other clinical or laboratory parameters of renal function and SLE activity. Glomerular C4d deposition did not show any specific trend stratified by all clinical and laboratory variables. Clinical and laboratory correlations of platelet aggregates, macrophage infiltration, and C4d deposition are detailed in Table 2.

As initial therapy for LN, all patients received high doses of steroids ( $\geq 1$  mg/kg/day) as well as one of the following immunosuppressive drugs: cyclophosphamide (79%), mycophenolate mofetil (17.7%), or azathioprine (1.6%). In addition, 54.2% received aspirin, and 5.1% oral anticoagulants. Most patients (77%) had been treated with steroids before LN development for other

manifestations at variable doses (Table 1). Twenty patients were treated with low-dose aspirin, and two patients were taking oral anticoagulation before LN development. In most patients treated with aspirin, indication was positive for LA and/or aCL antibodies ( $n = 12$ ). Some patients received aspirin for HBP. The two patients receiving oral anticoagulation had previous venous or arterial thrombosis. Different groups of patients stratified by aspirin or steroid dose did not show any trend toward a different expression of LN or platelet aggregates incidence, or differences in the long-term outcomes. Fifty (83.3%) patients responded to treatment, and the mean time to partial or complete response was of 15.2 months (range, 1 to 101 months). To analyze the potential long-term effect of immunohistochemical findings on clinical and renal outcomes, we selected only patients homogeneously treated with intravenous cyclophosphamide according to the NIH protocol after excluding repeated episodes of LN [24]. In brief, induction therapy consisted of six monthly boluses of intravenous cyclophosphamide (0.5 to 1 g per square meter, further adjusted by leukocyte count) and glucocorticoids. After 6 months, patients were treated with intravenous cyclophosphamide boluses every 3 months and for at least 12 months after remission or stability. Maintenance therapy was variable and, according to clinical practice, included azathioprine, mycophenolate mofetil, or antimalarials with glucocorticoids. Taking into account only those patients ( $n = 43$ ) who had received the same induction treatment, we did not find significant correlations between the presence of CD61<sup>+</sup> microthrombi, macrophagic infiltration, or C4d deposition, and clinical outcomes including percentage of response to therapy, mean time to response, percentage of relapse, and long-term renal function.

## Discussion

These data show that renal microthrombosis is highly prevalent in LN, affecting half of the patients with proliferative LN. It is more prevalent in patients with aPL, consistent with previous reports [13]. Moreover, microthrombosis correlates with higher macrophagic infiltration as a marker of inflammatory activity but not with C4d deposition. However, only macrophagic infiltration showed a correlation with SLE renal activity (proteinuria and active sediment), and neither the presence of CD61<sup>+</sup> microthrombi nor C4d deposition correlated with LN severity or outcome. Although the mechanisms of thrombosis may be different, previous studies point to complement activation and inflammation as common mechanisms in LN- and aPL-associated vascular pathology. In APS, a “two hits” theory has been proposed, in which the presence of aPL would lead to thrombophilia through endothelial cell, platelet, and monocyte



**Table 2 Clinical and laboratory associations of CD61-positive microthrombi, CD68-positive macrophage infiltration, and C4d deposition**

	CD61 microthrombi		CD68 <sup>+</sup> infiltration		C4d deposition	
	+	-	Glomerular	Extraglomerular	Glomerular	Extraglomerular
SLEDAI						
	20.5 ± 6.9	20.3 ± 6.6	$r = 0.5^a$	$r = 0.3^a$	$r = -0.1$	$r = 0.4^a$
aPL						
+	69%	33%	1.9 ± 1.9	1 ± 1.3	2.6 ± 2.9	0.9 ± 1.4
-	31%	67%	2.1 ± 3.1	0.4 ± 0.6	2.9 ± 4.7	1 ± 1.2
anti-dsDNA						
+	91%	74%	2.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 1	2.4 ± 2.9	1.2 ± 1.4 <sup>a</sup>
-	9%	26%	0.6 ± 0.7	0.5 ± 0.8	3.8 ± 6	0.5 ± 0.5
Low complement						
+	94%	87%	2.6 ± 3.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 1	2.4 ± 2.9	1.1 ± 1.4
-	6%	13%	0.5 ± 0.5	0.9 ± 0.9	5.4 ± 8	0.8 ± 0.5
24-hour proteinuria (g)						
	3.2 ± 3.1	3.6 ± 3.6	$r = 0.4^a$	$r = 0.4^a$	$r = 0.1$	$r = 0.3^a$
Hematuria						
+	88%	84%	2.7 ± 3.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.9	2.7 ± 3.9	1.1 ± 1.4
-	12%	16%	0.6 ± 0.7	0.6 ± 1.4	2.9 ± 2.9	0.5 ± 0.6
Leukocyturia						
+	76.50%	84%	2.7 ± 3.2 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.9	2.7 ± 3.6	1.1 ± 1.4
-	23.50%	16%	1.3 ± 1.5	0.7 ± 1.2	2.8 ± 4.5	0.8 ± 1
Cellular casts						
+	62%	68%	3.1 ± 3.5 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.8	3.1 ± 4.2	1.1 ± 1.2
-	38%	32%	1.1 ± 1.3	0.7 ± 1.3	2.1 ± 2.7	0.9 ± 1.6
Creatinine clearance						
	97.9 ± 50.2	84.3 ± 35.6	$r = -0.01$	$r = -0.2$	$r = 0.1$	$r = -0.1$
Response to treatment						
+	81%	95%	3.1 ± 3.5	0.8 ± 0.9	2.9 ± 4.2	1.2 ± 1.5
-	19%	5%	2.2 ± 1.4	1.3 ± 1.7	1.9 ± 1.5	0.9 ± 0.4
Mean time to response						
	25.1 ± 27.9	8.8 ± 10.8	$r = -0.15$	$r = -0.26$	$r = -0.17$	$r = -0.05$
LN relapse						
+	33%	45%	2.8 ± 3.3	0.6 ± 0.7	1.9 ± 2.9	1.1 ± 1.1
-	67%	55%	3.4 ± 4.4	0.7 ± 0.8	2.9 ± 3.5	1.4 ± 1.9
Renal failure at 1 year						
+	17.40%	15%	3.2 ± 3.6	0.8 ± 0.9	2.9 ± 4.2	1.3 ± 1.6
-	82.60%	85%	1.9 ± 2.1	1.5 ± 1.6	1.3 ± 1.7	1.2 ± 0.7
Renal failure at last visit						
+	20.80%	30%	3.3 ± 3.7	0.9 ± 1	3 ± 4.4	1.3 ± 1.6
-	79.20%	70%	2.1 ± 1.9	1 ± 1.4	1.5 ± 1.7	1 ± 0.7

<sup>a</sup> $P < 0.05$ .

activation ("first hit"), and a "second hit" related to inflammation (that is, Toll-like receptors and complement activation, in response to microbial agents, might synergize and result in clotting events [25]. Our data link inflammatory infiltration and thrombosis in LN but are less clear regarding the relation of complement activation and thrombosis.

Several studies point to the involvement of complement in the pathogenesis of APS. In animal models, complement factors C3 and C5 are essential in aPL-mediated pathology [15]. In these models, endothelial cell activation and inflammatory cell infiltration around blood vessels are observed in placental lesions, suggesting that complications of pregnancy are primarily due to inflammation [14]. In humans, a few studies also point to complement activation in aPL-mediated thrombosis [26-28]. Sera from patients with positive aPL enhance complement fixation on platelets, which is associated with arterial thrombosis [16]. Platelet-associated C4d has been reported in 18% of patients with SLE, particularly in those with aPL [29]. In addition, hypocomplementemia and increased plasma levels of anaphylotoxins

C3a and C4a have been described in primary APS [26]. However, a direct correlation between increased levels of anaphylotoxins and clinical thrombosis has not been demonstrated [26,28].

Specifically in LN, immune-mediated vascular injury may predispose to platelet accumulation and *in situ* complement activation. Intense glomerular C4d deposition has been previously found associated with renal microthrombi in LN patients with or without aPL [15,28]. However, because both processes may be associated with proliferative LN and higher activity indexes, this may be an indirect association [26]. We have specifically analyzed patients with proliferative LN and considered macrophage infiltration as an additional marker of inflammatory activity. Our data do not demonstrate a direct relation between C4d deposition and microthrombosis. Instead, C4d deposition correlated with the intensity of macrophagic infiltration, which in turn was associated with microthrombosis. Deposition of C4d in peritubular capillaries reflected SLE activity, consistent with previous reports [30,31]. Neither C4d nor microthrombi were directly related to the severity or outcome of LN.

The detection of CD61 intravascular platelets with IHC is far more sensitive to acute microthrombi in patients with LN compared with routine histologic methods. Thrombi detected with regular histology might have a different impact on renal outcomes but are rarely observed. Clinical observations support that TMA in APS or SLE nephritis has an important impact on renal function and requires specific therapy. However, TMA may occur independent of SLE nephritis, and its prevalence associated with LN is very low. Only two cases had microthrombi detected by histology in our series, precluding analyses of the clinical and subclinical (immunohistochemical) correlations in LN. Our data do not support any difference in renal manifestations and outcomes at 6 and 12 months, and further follow-up after therapy in patients with IHC detected CD61-positive microthrombi. The retrospective design of our study limits the interpretation of results regarding clinical correlations and prognosis. Microthrombi detected with IHC may have a lower impact on renal function and outcome than do larger histologic microthrombi. Longitudinal prospective studies, including patients with LN and repeated biopsies after induction treatment, will help us to better define the real significance of this kind of histologic and IHC lesion.

Macrophagic infiltration was the best marker of renal impairment at kidney biopsy, consistent with previous studies [32]. Glomerular and interstitial macrophage infiltration is a feature of the more aggressive forms of LN and the individual variable that best correlates with clinical parameters, including SLE activity and renal manifestations. We found a correlation with activity measures, including the level of proteinuria and active sediment, but not with renal function at biopsy or follow-up. A previous study showed that the persistence of glomerular and extraglomerular macrophagic infiltrates after therapy correlates with long-term renal-function outcomes (doubling of serum creatinine and end-stage renal disease) [32]. However, neither these nor our data demonstrates predictive value for the degree of macrophage infiltration at first biopsy and renal-function outcomes.

## Conclusions

In summary, our results show a relation between renal microthrombi and local inflammatory cells infiltration in patients with LN. Renal macrophagic infiltration was the best marker of SLE and renal clinical activity, whereas microthrombi or C4d deposition did not have a direct correlate with severity or prognosis in LN.

## Abbreviations

aCL: anticardiolipin antibodies; aPLs: antiphospholipid antibodies; APS: antiphospholipid syndrome; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; HBP: high blood pressure; IHC: immunohistochemistry; ISN/RPS: international

society of nephrology/renal pathology society; LA: lupus anticoagulant; LN: lupus nephritis; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; NIH: national institute of health; OR: odds ratio; PAS: phosphotungstic acid-hematoxylin; SLE: systemic lupus erythematosus; TGF-beta 1: transforming growth factor-beta 1; TMA: thrombotic microangiopathy; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Gabriel Usera for his help with kidney histopathology. This study was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (PI06/90374) and RIER (Red de Inflamación y Enfermedades Reumáticas RD08/0075).

## Author details

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Avenida de Córdoba sn, 28041 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba sn, 28041 Madrid, Spain. <sup>3</sup>Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba sn, 28041 Madrid, Spain. <sup>4</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Avenida Carlos Haya sn, 29010 Málaga, Spain. <sup>5</sup>Unidad de Investigación de la Fundación Española de Reumatología, Sociedad Española de Reumatología, Calle Marqués del Duero 5, 1º, 28001 Madrid, Spain. <sup>6</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Avenida Carlos Haya sn, 29010 Málaga, Spain.

## Authors' contributions

EG and BS carried out IHC analyses. OT, IG, and ML carried out histologic studies at Hospital 12 de Octubre (OT) and Hospital Regional Carlos Haya (IG, ML), respectively. MPM, MG, MCO, and AFN participated in collecting and analyzing clinical data, both at Hospital 12 de Octubre (MPM, MG) and at Hospital Regional Carlos Haya (MCO, AF), respectively. EL participated in the design and statistical analysis. JLP and MG participated in the conception and design of the study, coordination, and analysis of data. All authors participated in drafting and revising the manuscript and read and approved its final version.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 17 October 2011 Revised: 11 May 2012

Accepted: 28 May 2012 Published: 28 May 2012

## References

1. Cameron JS: **Lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 1999, **10**:413-424.
2. Austin HA III, Boumpas DT, Vaughan EM, Balow JE: **High-risk features of lupus nephritis: importance of race and clinical and histological factors in 166 patients.** *Nephrol Dial Transplant* 1995, **10**:1620-1628.
3. Esdaile JM, Federgreen W, Quintal H, Suissa S, Hayslett JP, Kashgarian M: **Predictors of one year outcome in lupus nephritis: the importance of renal biopsy.** *Q J Med* 1991, **81**:907-918.
4. Yang N, Isabel NM, Nikolic-Paterson DJ, Li Y, Ye R, Atkins RC, Lan HY: **Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis.** *Kidney Int* 1998, **54**:143-151.
5. Takemura T, Yoshioka K, Murakami K, Akano N, Okada M, Aya N, Maki S: **Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis.** *Virchows Arch* 1994, **424**:459-464.
6. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, Schena FP: **Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment.** *J Am Soc Nephrol* 1996, **7**:906-913.
7. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi K, Matsushima K: **Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis.** *Kidney Int* 1996, **49**:761-767.
8. Wagrowska-Danilewicz M, Stasikowska O, Danilewicz M: **Correlative insights into immunoeexpression of monocyte chemoattractant protein-1, transforming growth factor beta-1 and CD68+ cells in lupus nephritis.** *Pol J Pathol* 2005, **56**:115-120.
9. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Tomkiewicz E, Rémy P, Mignon F, Méry JP: **A new morphologic index for the evaluation of renal biopsies in lupus nephritis.** *Kidney Int* 2000, **58**:1160-1173.



10. Descombes E, Droz D, Drouet L, Grünfeld JP, Lesavre P: **Renal vascular lesions in lupus nephritis.** *Medicine (Baltimore)* 1997, **76**:355-368.
11. Nochy D, Daugas E, Droz D, Beauflis H, Grünfeld JP, Piette JC, Bariety J, Hill G: **The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome.** *J Am Soc Nephrol* 1999, **10**:507-18.
12. Tektonidou MG, Sotsiou F, Nakopoulou L, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM: **Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:2569-2579.
13. Galindo M, Gonzalo E, Martinez-Vidal MP, Montes S, Redondo N, Santiago B, Loza E, Pablos JL: **Immunohistochemical detection of intravascular platelet microthrombi in patients with lupus nephritis and antiphospholipid antibodies.** *Rheumatology* 2009, **48**:1003-1007.
14. Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, Hollmann TJ, Casali P, Carroll MC, Wetsel RA, Lambris JD, Holers VM, Salmon JE: **Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome.** *J Clin Invest* 2003, **112**:1644-1654.
15. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J: **Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:2120-2124.
16. Peerschke EI, Yin W, Alpert DR, Roubey RA, Salmon JE, Ghebrehwet B: **Serum complement activation on heterologous platelets is associated with arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies.** *Lupus* 2009, **18**:530-538.
17. Cohen D, Koopmans M, Kremer Hovinga ICL, Berger SP, Roos van Groningen M, Steup-Beekman GM, de Heer E, Bruijn JA, Bajema IM: **Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:2460-2469.
18. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: **The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1982, **25**:1271-1277.
19. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M: **The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited.** *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**:241-250.
20. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA: **International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:1309-1311.
21. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG: **Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection.** *J Thromb Haemost* 2009, **7**:1737-1740.
22. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH: **Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients: the Committee on Prognosis Studies in SLE.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**:630-640.
23. **Image J: Image processing and analysis in Java.** [http://rsb.info.nih.gov/ij].
24. Austin HA, Klippel JH, Balow JE, Le Riche NG, Steinberg AD, Plotz PH, Decker JL: **Therapy of lupus nephritis: controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs.** *N Engl J Med* 1986, **314**:614-619.
25. Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, Journe N, Brunet P, Camoin-Jau L, Sampol J, Dignat-George F: **Endothelial-derived microparticles: biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis.** *Thromb Haemost* 2010, **104**:456-463.
26. Distelmaier K, Adlbrecht C, Jakowitsch J, Winkler S, Dunkler D, Gerner C, Wagner O, Lang IM, Kubicek M: **Local complement activation triggers neutrophil recruitment to the site of thrombus formation in acute myocardial infarction.** *Thromb Haemost* 2009, **102**:564-572.
27. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T: **Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68**:1030-1035.
28. Shen Y, Chen XW, Sun CY, Dai M, Yan YC, Yang CD: **Association between anti-beta2 glycoprotein I antibodies and renal glomerular C4d deposition in lupus nephritis patients with glomerular microthrombosis: a prospective study of 155 cases.** *Lupus* 2010, **19**:1195-1203.
29. Navratil JS, Manzi S, Kao AH, Krishnaswami S, Liu CC, Ruffing MJ, Shaw PS, Nilson AC, Dryden ER, Johnson JJ, Ahearn JM: **Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:670-674.
30. Kim SH, Jeong HJ: **Glomerular C4d deposition indicates in situ classic complement pathway activation, but is not a marker for lupus nephritis activity.** *Yonsei Med J* 2003, **44**:75-80.
31. Li SJ, Liu ZH, Zen CH, Wang QW, Wang Y, Li LS: **Peritubular capillary C4d deposition in lupus nephritis different from antibody-mediated renal rejection.** *Lupus* 2007, **16**:875-880.
32. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Rémy P, Mignon F, Méry JP, Bariety J: **Predictive power of the second renal biopsy in lupus nephritis: significance of macrophages.** *Kidney Int* 2001, **59**:304-316.

doi:10.1186/ar3856

**Cite this article as:** Gonzalo et al.: Clinicopathologic correlations of renal microthrombosis and inflammatory markers in proliferative lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy* 2012 **14**:R126.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## 9.3 ANEXO 3





**INDICE DE ACTIVIDAD DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO. SLEDAI**  
(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, Bombardier et al, 1992)

Fecha: \_\_/\_\_/\_\_

NOMBRE: \_\_\_\_\_

Puntuación	SLEDAI	Descriptor	Definición
8		Convulsiones	De comienzo reciente. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos.
8		Psicosis	Habilidad alterada para la función diaria debido a alteración grave en la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, asociaciones ilógicas, contenido mental escaso, pensamiento ilógico, raro, desorganizado y comportamiento catatónico. Excluir I. renal y fármacos
8		Sdme orgánico-cerebral	Función mental alterada con falta de orientación, memoria, u otras funciones intelectuales, de comienzo rápido y manifestaciones clínicas fluctuantes. Incluye disminución del nivel de conciencia con capacidad reducida para focalizar, e inhabilidad para mantener la atención en el medio, más, al menos dos de los siguientes: alteración de la percepción, lenguaje incoherente, insomnio o mareo matutino, o actividad psicomotora aumentada o disminuida. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos..
8		Alteraciones visuales	Retinopatía lúpica. Incluye cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos y hemorragias en la coroides, o neuritis óptica. Excluir HTA, infección o fármacos.
8		Alt. Pares craneales	De reciente comienzo, motor o sensitivo.
8		Cefalea lúpica	Grave, persistente; puede ser migrañosa pero no responde a analgésicos narcóticos.
8		AVC	De reciente comienzo. Excluir arteriosclerosis.
8		Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos sensibles, infartos periungueales, hemorragias en astilla o biopsia o angiografía que confirme la vasculitis.
4		Miositis	Debilidad proximal/dolor asociado a elevación de las CPK/aldolasa o EMG sugestivo o miositis comprobada por biopsia.
4		Artritis	Más de dos articulaciones dolorosas y con signos inflamatorios.
4		Cilindros urinarios	Cilindros hemáticos o granulosos.
4		Hematuria	>5 hematíes/c. Excluir litiasis, infección u otras causas.
4		Proteinuria	> 5 g/24 h. De reciente comienzo o aumento de la proteinuria ya conocida en más de 0.5 g/24 h.
4		Piuria	> 5 leucocitos/c. Excluir infección.
2		Exantema nuevo	Comienzo reciente o recurrente. Exantema inflamatorio.
2		Alopecia	De comienzo reciente o recurrente. Pérdida difusa o en placas.
2		Ulceras bucales	De comienzo reciente o recurrente. Ulceras bucales o nasales.
2		Pleuritis	Dolor pleurítico con roce o derrame, o engrosamiento pleural.
2		Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes: roce, derrame, cambios electrocardiográficos o confirmación ecocardiográfica.
2		Complemento	Descenso de CH50, C3, C4 por debajo del límite inferior del laboratorio.
2		Anti DNA	> 25%. Técnica de Farr o por encima del valor habitual del laboratorio.
1		Fiebre	> 38°C. Excluir infección.
1		Trombopenia	< 100.000 plaquetas/mm3.
1		Leucopenia	< 3.000 células/mm3. Excluir fármacos.
<b>PUNTUACION TOTAL</b>		<i>Nota: puntúa en la escala SLEDAI si el descriptor está presente en el día de la visita o 10 días antes.</i>	