

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO INMUNOGENETICO E INMUNOHISTOQUIMICO
DE LA ARTERITIS DE HORTON

Tesis presentada por
M. CINTA CID XUTGLA
para acceder al grado
de Doctor.

BARCELONA 1989

M A T E R I A L Y M E T O D O S

I.- ESTUDIO INMUNOGENETICO.

I.1.- PACIENTES.

Han formado parte del estudio 65 pacientes diagnosticados de AH, todos ellos con confirmación histológica de la enfermedad obtenida mediante biopsia de la arteria temporal superficial. Diecisiete eran varones y 48 mujeres, de edades comprendidas entre 62 y 85 años (x 73 años). Treinta y cinco pacientes procedían del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, 25 del Hospital General Valle Hebrón, 2 del Hospital de N Sra de la Esperanza, 1 del Hospital N Sra del Mar, 1 de la Quinta de Salud "La Alianza" y 1 del Hospital Mutua de Terrassa.

De cada enfermo se obtuvo información acerca de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, actividad y tiempo de evolución de la misma y tratamiento seguido en el momento de ser evaluados. Los datos clínicos de 31 pacientes fueron recogidos personalmente en el momento en que se realizó el diagnóstico. De los restantes, la información se obtuvo retrospectivamente a partir de la revisión de sus historias clínicas completada con una entrevista personal con cada paciente y sus familiares.

La existencia de PMR se estableció en base a los criterios de Bird y Esselinckx (62) (Tabla 6). Dada la existencia de una biopsia temporal positiva que garantizaba el diagnóstico, únicamente se tomaron en consideración los criterios 1, 2, 4 y 7. Al carecer la PMR de alteraciones objetivas y puesto que sus características se evaluaron de forma retrospectiva en los pacientes en remisión, se estableció el score detallado en la tabla 7 para valorar su intensidad. De manera similar a otros autores (48, 49, 267) los principales datos tenidos en cuenta fueron el motivo de consulta y la severidad de la PMR valorada en cuanto a limitación funcional y el tiempo que medió entre el inicio de la PMR y el momento en que los pacientes requirieron atención médica, asumiendo que a mayor tiempo de espera menor intensidad de los síntomas y viceversa. La PMR se consideró severa en los pacientes que obtenían una puntuación igual o superior a 3.

Se consideraron en actividad aquellos pacientes evaluados antes de iniciar tratamiento o dentro de la primera semana tras el inicio del mismo, así como aquellos que, estando por más tiempo bajo tratamiento, presentaban manifestaciones características de la enfermedad (signos o síntomas craneales y/o PMR) y una VSG (Westergren) superior o igual a 40 mm. a la primera

TABLA 6: CRITERIOS DE BIRD Y ESSELINCK PARA EL DIAGNÓSTICO DE PMR.

1. Dolor y/o rigidez simétrica en hombros.
 2. Configuración completa del cuadro clínico en ≤ 2 semanas.
 3. VSG > 40 .
 4. Rigidez matutina de más de 1 hora de duración.
 5. Edad $>$ a los 65 años.
 6. Depresión y/o pérdida de peso.
 7. Dolor a la palpación de la musculatura proximal de los brazos.
-

TABLA 7: VALORACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LA PMR.

MOTIVO PRINCIPAL DE CONSULTA	PUNTOS
PMR	3
Manifestaciones craneales + PMR	2
Manifestaciones craneales o generales	1
PMR por interrogatorio dirigido	0
TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA PMR antes de consultar	
≤ 3 meses	0
> 3 meses	-2
≤ 3 meses pero con remisión espontánea o con AINE	-2
INTENSIDAD DE LA PMR	
Pérdida de autonomía para cuidados personales	3
Si hay pérdida de autonomía pero coexiste enfermedad reumatológica o neurológica incapacitante	0

hora. Se consideraron en remisión aquellos enfermos asintomáticos tratados durante un período de tiempo superior a una semana e inferior a tres años. Los pacientes en remisión con un tiempo de evolución superior a 3 años se consideraron de larga evolución.

I.2.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Previo consentimiento explícito se extrajeron mediante venopunción 50 ml. de sangre a cada paciente. En aquellos enfermos que recibían corticosteroides, la extracción se realizó a las 24 horas de la última administración, puesto que estos fármacos disminuyen la adhesividad y la expresión de antígenos de clase II en las células que poseen estos atributos (52, 147). Ambas propiedades son fundamentales para la detección de los antígenos DR y DQ. Dado que este efecto persiste únicamente 24 horas, con esta medida se consiguió aumentar la calidad técnica del procedimiento y facilitar su interpretación.

I.2.1.- OBTENCION DE LINFOCITOS.

Cuarenta ml. de sangre se colocaron en un matraz Erlenmeyer con bolitas de vidrio de 5 mm. de diámetro en su interior (una bolita por ml. de sangre). Seguidamente la sangre se desfibrinó mediante suave agitación manual o mecánica durante 10 minutos. En los

casos procedentes de otros centros, en este momento se procedía al traslado de la muestra.

I.2.1.1.- SEPARACION DE LINFOCITOS TOTALES.

El método empleado para obtener células mononucleadas ha sido el descrito por Boyum (79). La sangre del paciente problema, una vez desfibrinada, se tampona con 1'5 veces su volumen (60 ml.) de PBS (phosphate-buffered saline), pH 7'2 (Bio-mérieux).

Se preparan a continuación unos 8-12 tubos de ensayo con 3-4 ml. de Ficoll-400 (Pharmacie)- Pielograf (Juste) preparado a una densidad de 1.077. Si bien su adecuada conservación tiene lugar a 4°C. el Ficoll-Pielograf debe utilizarse a temperatura ambiente. Seguidamente se deposita en cada tubo una jeringa de 10 ml. con aguja y sin émbolo. La sangre se vierte en su interior y se desliza cuidadosamente por acción de la gravedad por las paredes del tubo. Debe quedar depositada sobre el Ficoll-Pielograf sin mezclarse formando una interfase. Posteriormente se centrifugan los tubos a 2.000 r.p.m. durante 25 minutos. Tras la centrifugación se obtienen en cada tubo 4 fases: en el fondo los hematíes y granulocitos, seguidamente el Ficoll-Pielograf, por encima una corona de células mononucleares y el resto plasma con PBS. Mediante una

pipeta Pasteur se aspira cuidadosamente el anillo linfocitario. La suspensión de linfocitos se centrifuga a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos, se decanta y se resuspende en PBS. Este lavado se repite 3 veces y tras el último se suspende en 3 ml. de PBS.

La determinación de antígenos de clase I, de distribución prácticamente universal, puede realizarse en los linfocitos totales así obtenidos. Si se desea determinar también los antígenos de clase II, presentes en los linfocitos B, es necesario separar las poblaciones linfocitarias B y T. Los linfocitos T se utilizarán en este caso para identificar los antígenos de clase I (A, B y C) y los linfocitos B para determinar los antígenos de clase II (DR y DQ).

I.2.1.2.- SEPARACION DE LINFOCITOS T Y B.

La técnica de separación de los linfocitos T y B se basa en la adhesividad de estos últimos a la fibra de nylon cuando se hallan en condiciones metabólicas adecuadas.

Para este procedimiento se requiere un medio de cultivo que se prepara disolviendo 2'6 gr. del preparado comercial RPMI-1.640 (Gibco) y 300 mg. de bicarbonato sódico en 200 ml. de agua destilada. Se añaden

50 ml. de suero de caballo previamente inactivado durante 1 hora a 56°C., y 2'5 ml. de tampón Hepes (Flow). Esta cantidad sirve para estudiar 2 casos. El medio de cultivo debe permanecer tapado para mantener el pH y se conserva a 37°C excepto 10 ml. que se guardan a temperatura ambiente.

Se pesan 300 mg. de fibra de nylon. Se esponja y deshílacha uniformemente y con ella se llena una jeringa de 5 ml. sin aguja. Se preparan 50 ml. de una solución 0'2 N de HCl y se lava 5 veces alternando 10 ml. de la solución de HCl y 10 ml. de agua destilada. Finalmente se lava con 50 ml. de medio de cultivo. Se obtura la punta, se llena la jeringa con medio de cultivo, se tapa y se mantiene a 37°C. durante al menos 30 minutos.

Tras el tercer centrifugado y decantación los linfocitos se suspenden en 1 ml. de medio de cultivo. La jeringa se destapa y con su émbolo se reduce el volumen del contenido en medio del cultivo y fibra de nylon a 2 ml. Se vuelve a obturar la salida y se vierte en ella, gota a gota, la suspensión de linfocitos procurando que contacte bien con la fibra. Se acaba de llenar la jeringa con medio de cultivo, se tapa y se incuba durante 30 minutos a 37°C en posición

vertical. Pasado este tiempo el contenido de la jeringa se eluye en 10 ml. de medio de cultivo que arrastra las células no adherentes (linfocitos T). Se lava la fibra con 50 ml. adicionales de medio a 37°C que se desprecian. Seguidamente se recoge la fibra, se coloca en un colador, se expande y manipula cuidadosamente con dos agujas y se lava con 10 ml. de medio de cultivo a temperatura ambiente que arrastra los linfocitos B previamente adheridos a la fibra. Quedan así separadas las suspensiones de linfocitos T y B en 10 ml. de medio de cultivo respectivamente.

I.2.2.- OBTENCION DE SUERO.

De los 50 ml. de sangre extraídos a cada paciente, los 10 ml. restantes fueron transferidos a un tubo de vidrio que se mantuvo a temperatura ambiente. Al cabo de 1 hora la muestra se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos y el suero obtenido se distribuyó en alícuotas y congeló a -70°C. hasta su utilización.

I.3.- DETERMINACION DE LOS ANTIGENOS HLA.

En este estudio hemos utilizado el método de microlinfocitotoxicidad descrito por Terasaki (570).

En esencia, la técnica consiste en enfrentar los linfocitos del paciente problema frente a sueros que

contienen anticuerpos contra antígenos del sistema HLA de especificidad conocida. Cuando existe reacción, la adición de complemento produce lisis celular que se pone de manifiesto por la penetración en el interior de las células de un colorante vital. La técnica tiene lugar en las siguientes etapas:

I.3.1.- OBTENCION DE LOS SUEROS ESPECIFICOS.

Los sueros portadores de anticuerpos frente a antígenos del sistema HLA provienen habitualmente de donantes sensibilizados (pacientes politransfundidos o mujeres gestantes o púerperas). Los sueros se enfrentan a un panel de células cuyos antígenos son conocidos por haber sido testados con sueros de especificidad internacionalmente homologada. Con el fin de disponer de sueros más específicos suele existir intercambio de los mismos entre los distintos laboratorios de histocompatibilidad.

I.3.2.- PREPARACION DE LAS PLACAS DE TERASAKI.

La reacción de citotoxicidad se realiza en soportes plásticos provistos de 60 pocillos distribuidos en 10 filas y 6 columnas, denominados placas de Terasaki. Los pocillos se llenan de aceite de parafina y en su interior se deposita mediante una microjeringa 1 ml. de los sueros de especificidad conocida, seleccionados

para abarcar el espectro de especificidades que se desee determinar.

De los antígenos reconocidos en el Workshop de Histocompatibilidad de 1984 (tabla 4), se han investigado en este estudio los expuestos en la tabla 8, puesto que los restantes, descritos en otras etnias, son excepcionales en nuestra población. Para identificar a cada antígeno se incluían al menos 3 sueros mono o biespecíficos. Se han utilizado, así, un total de 179 sueros para identificar a los antígenos de clase I (A, B, C) y 58 para los antígenos de clase II (DR y DQ). Los antígenos de clase II Dw y DP no se han estudiado puesto que su detección no se realiza por medios serológicos sino mediante técnicas celulares: cultivo linfocitario mixto y PLT (Primed Lymphocyte Typing) o tipaje celular mediante linfocitos sensibilizados, respectivamente.

Una vez preparadas las placas, se congelan a 70°C. hasta su utilización.

I.3.3.- REACCION DE CITOTOXICIDAD.

Los linfocitos T y B separados se centrifugan, se decantan de nuevo y se suspenden en 3 ml. y 1 ml. de PBS respectivamente. Se cuenta el número de células

TABLA 8: ANTÍGENOS HLA ESTUDIADOS.

A	B	C	DR	DQ	
A1	B5	B44	Cw1	DR1	DQw1
A2	B7	B45	Cw2	DR2	DQw2
A3	B8	Bw47	Cw3	DR3	DQw3
A9	B12	B49	Cw4	DR4	
A11	B13	Bw50	Cw5	DR5	
Aw19	B14	B51	Cw6	DRw6	
A23	B18	Bw52	Cw7	DRw7	
A24	B21	Bw53	Cw8	DRw8	
A25	Bw22	Bw55		DRw9	
A26	B27	Bw57		DRw10	
A28	B35	Bw58			
A29	B37	Bw60		DRw52	
A30	B38	Bw61		DRw53	
A31	B39	Bw62			
A32	Bw41	Bw63			
A33					
	Bw4	Bw5			

con un contador (Coulter counter) y se ajustan a una concentración de 3×10^6 células/ml.

Seguidamente se distribuye mediante una microjeringa (Hamilton) un microlitro de la solución de linfocitos T en cada pocillo de las placas de Terasaki previamente descongeladas que contienen antisueros frente a antígenos de clase I, y un microlitro de linfocitos B en los pocillos de las placas que contienen antisueros frente a antígenos de clase II. Debe procurarse que la suspensión inyectada contacte con la gotita de antisero preexistente suspendida en el aceite de parafina. Se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos los linfocitos T y durante 60 minutos los linfocitos B. Al finalizar la incubación, mediante una microjeringa múltiple Hamilton se añade a cada pocillo 5 microlitros de suero fresco de conejo, como fuente de complemento, y se incuban de nuevo durante 60 minutos los linfocitos T y 120 minutos los linfocitos B. Durante este período, al haber añadido el complemento contenido en el suero de conejo tiene lugar la reacción de citotoxicidad en aquellos pocillos donde ha existido unión entre los antígenos HLA presentes en la membrana de los linfocitos y sus anticuerpos específicos. Transcurrido este tiempo se añade a cada pocillo 3 microlitros del colorante vital eosina al 5% en solución acuosa.

sa y, como fijador, 6 microlitros de formol al 30% tamponado con NaOH a pH 7'20.

I.3.4.- LECTURA E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Trancurrída 1 hora, una vez finalizada la técnica, puede efectuarse la lectura de las placas en un microscopio invertido de contraste de fase. En este estudio se ha utilizado un Leitz (Diavert) a un aumento de 100x.

En los pocillos donde no ha existido reacción, los linfocitos aparecen como pequeñas esferas refringentes. Si la reacción de citotoxicidad ha sido positiva, las células aparecen de mayor tamaño y teñidas de color rojo oscuro en un porcentaje variable.

La intensidad de la reacción citotóxica se evalúa en una escala de 0 a 8 en cifras pares, según el porcentaje aproximado de células lisadas estimado subjetivamente. Así, 0 equivale a una citotoxicidad que afecta al menos al 20% de las células, 2 a un 20-40%, 4 a un 40-60%, 6 a un 60-80% y 8 a un 80-100%. Se considera positiva la reacción a partir de 4 puntos, dado que puede existir cierta mortalidad inespecífica por la manipulación a que son sometidas las células, más cons-

tante en el caso de los linfocitos B cuya separación es más traumática. Las placas incluyen un control negativo sin anti suero que valora la mortalidad de base. La viabilidad de las células puede evaluarse antes del montaje de las placas mediante tinción con el colorante vital azul Tripán (Gibco). El grado de citotoxicidad obtenida en las reacciones para antígenos de clase I suele ser del 80-100% . Para los antígenos de clase II el porcentaje suele ser inferior dado que siempre suele existir cierta contaminación por linfocitos T. En la placa se incluye un control positivo anti-DR monomérico que indica el porcentaje de contaminación por células T y se valora como el 100% de positividad. La interpretación es, pues, más dificultosa para los antígenos de clase II. Generalmente se utilizan varios sueros distintos para identificar a cada antígeno y se requiere positividad en la mayoría de ellos para considerar a las células portadoras del mismo. Para establecer el resultado definitivo se exige concordancia en la lectura realizada separadamente por dos experimentadores.

I.3.5.- GRUPO CONTROL.

El grupo control para la valoración de los antígenos de histocompatibilidad estuvo formado por 200 donantes de órganos procedentes de la misma área geográfica.

fica y sin vínculos familiares entre sí. No se utilizó una población de la misma distribución de edad y sexo puesto que la prevalencia de los antígenos HLA en las poblaciones no resulta influenciada por estos parámetros (43).

I.4.- DETERMINACIONES SEROLOGICAS.

I.4.1.- DETECCION DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES.

Los complejos inmunes circulantes (CI) se han determinado mediante una técnica de unión a la conglutinina en fase sólida. La conglutinina es una proteína bovina que tiene la propiedad de unirse específicamente al C3bi o forma inactivada del C3b y, por tanto, constituye un ligando adecuado para la detección de CI fijados al complemento.

Para ello se ha utilizado un método inmunoensimático (ELISA) competitivo, basado en la competitividad de los CI con un inmunocomplejo experimental (β galactosidasa-anti- β galactosidasa) cuyo antígeno posee actividad enzimática. Los CI compiten con el inmunocomplejo experimental, en presencia de complemento, por unirse a la conglutinina a nivel de sus receptores para el C3bi. La cantidad del complejo β galactosidasa-

anti- β galactosidasa y, por tanto, la actividad enzimática detectable en la fase sólida al final de la reacción es inversamente proporcional a la concentración de los CI de la muestra o de la IgG agregada que constituye el control positivo. Como sustrato enzimático se utiliza el O-NPG (Orto-nitro-fenil-galactopiranosido) y la medida del producto de la reacción (orto-nitro-fenol) se realiza mediante un espectrofotómetro a 420 nm. Los productos utilizados se hallan incluidos en el Kit comercial Quantiplex CIC determination conglutinin-binding EIA (Kallestad). Los resultados se expresan como coeficiente de inhibición porcentual según la fórmula:

$$\frac{1 - \text{DO muestra}}{\text{DO control negativo}} \times 100$$

donde DO significa densidad óptica.

Para la detección de CI se utilizaron alícuotas del suero obtenido de los pacientes previamente y congelado a -70° . Los sueros se descongelaron a temperatura ambiente y se diluyeron al 50% en PBS, pH 7.0 (Bio-Mérieux). Doscientos microlitros de la dilución del suero problema y 200 de la muestra control se incubaron en 200 microlitros de anti- β galactosidasa obtenida en caballo, 100 microlitros de complemento bovino, 50 microlitros de β galactosidasa y una es-

ferita de poliestireno con conglutinina bovina. El tiempo de incubación era de 30 minutos a 37°C en baño maría seguidos de 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS tras los cuales se añadía 1 ml. del sustrato O-NPG. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C se detenía la reacción con 1 ml. de Na₂CO₃ 1M. A continuación se realizaba la lectura y el cálculo del porcentaje de inhibición.

En cada test se incluyeron 3 controles negativos y 6 positivos. Como control negativo se utilizó NaCl al 0'9% y como control positivo IgG humana agregada mediante calor a una concentración de 50 microgramos/ml. Además de este control positivo incluido en el Kit se utilizaron 2 controles positivos externos: una IgG agregada preparada en el propio laboratorio y una IgG agregada suministrada por la OMS.

1.4.2.- DETECCIÓN DE FACTORES REUMATOIDES.

La detección de factores reumatoides (FR) se llevó a cabo mediante el método de aglutinación de partículas de latex revestidas con gammaglobulina humana con el reactivo comercial RapiTex-RF (Behring). Este consta de una suspensión de partículas de poliestireno recubiertas de gammaglobulina humana, un suero control positivo compuesto por suero de carnero con actividad

anti IgG humana y un suero control negativo consistente en un suero humano con actividad FR inferior a 1 UI/ml.

Los sueros problema se diluyen 1 + 5 con solución salina isotónica al 0'9% . Se deposita una gota de la dilución, una gota del suero control positivo y una gota del suero control negativo sobre una placa de lectura de fondo oscuro. Sobre cada una de ellas se vierte una gota de la suspensión de látex y se balancea suavemente durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo se valora la existencia de aglutinación en el suero problema comparando con los sueros control. Una aglutinación clara indica la presencia de FR. La ausencia de aglutinación indica que la muestra no contiene FR o los contiene a una concentración inferior a 20 UI/ml. La titulación se realiza de modo semicuantitativo procediendo a la valoración de diluciones progresivas del suero problema. Se toma en consideración la dilución más alta en que todavía tiene lugar aglutinación y la concentración aproximada de FR se calcula según la siguiente correspondencia:

DILUCION	CONCENTRACION DE FR (UI/ml.)
1 + 5	20
1 + 10	40
1 + 20	80
1 + 30	120
1 + 40	160

II.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.

II.1. PACIENTES.

Setenta y dos pacientes en los que existía sospecha clínica de AH fueron sometidos a biopsia temporal en condiciones adecuadas para su posterior estudio inmunohistoquímico. Cuarenta y cuatro fueron excluidos: 36 porque la biopsia no fue diagnóstica de AH, 4 porque en el fragmento congelado no existía suficiente celularidad para un estudio correcto y 8 porque la conservación antigénica no fue apropiada para su valoración. Estos últimos casos procedían de otros centros hospitalarios y aunque se habían mantenido a 4°C, habían mediado varias horas desde la extirpación del fragmento arterial hasta su congelación. De los veinticuatro pacientes finalmente incluidos en el estudio se recogieron con detalle los datos clínicos y biológicos con especial referencia a los síntomas craneales, su tiempo de evolución y a la existencia y duración del tratamiento con corticoides previo a la biopsia.

De los pacientes estudiados, 5 eran varones y 19 mujeres con una edad media de 74 años. El tiempo de evolución de los síntomas craneales oscilaba entre 1 semana y 18 meses con una media de 2'6 meses. Diecisiete biopsias se obtuvieron antes de iniciar el trata-

miento (1 mg/Kg/día de prednisona) o dentro de los 4 primeros días tras el inicio del mismo. En los 7 pacientes restantes, la biopsia se obtuvo posteriormente: en 6, cuando llevaban entre 5 y 30 días de tratamiento y en 1 al recaer tras 18 meses recibiendo todavía pequeñas dosis de prednisona.

II.2. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS.

En todos los casos la biopsia tenía una longitud superior o igual a 2 cm. El transporte de la biopsia desde el quirófano al lugar de procesamiento se efectuó en una gasa humedecida con suero fisiológico.

Cada fragmento arterial se seccionó en dos porciones. Una parte se fijaba en formol neutro 10% para su inclusión en parafina. El segundo fragmento se congeló. Para este proceso se despreciaban los dos extremos de la biopsia y se seleccionaban áreas que macroscópicamente sugerían la existencia de patología subyacente (rigidez, engrosamiento de la pared, obstrucción de la luz, trombosis). Los fragmentos de 2-3 mm. eran montados en un soporte rígido de cinco por cinco milímetros e incluidos en OCT (Milles). La congelación se efectuó en isopentano (Merck) preenfriado en nitrógeno líquido. Las muestras eran conservadas a -80°C. en arcón congelador hasta su procesamiento. En

los casos en los que el fragmento destinado al estudio histológico para diagnóstico resultó negativo las porciones de la arteria congeladas se procesaron para su inclusión en parafina. Para ello se procedía a efectuar diversas secciones del material congelado en el criostato. Los cortes se dejaban secar durante 16-24 horas y posteriormente se fijaban en acetona diez minutos tras su secado se guardaban a -80°C hasta su procesamiento. El resto de material se descongelaba y se fijaba en formol tamponado al 10% y se incluía en parafina. En caso que tampoco existiera arteritis en estos fragmentos el caso era excluido del estudio.

II.3. CRITERIOS DE DIAGNOSTICO HISTOLOGICO.

El diagnóstico de AH se efectuó en base a los criterios de Allsop y Gallagher (16, 227). Estos autores clasificaron las AH en tres tipos: clásica, atípica y cicatricial según los siguientes criterios:

a) Arteritis de Horton clásica: Arterias con notable engrosamiento intimal. Infiltrado inflamatorio crónico intenso compuesto por linfocitos, histiocitos y células gigantes multinucleadas, con frecuencia íntimamente relacionadas con la lámina elástica interna.

b) Arteritis de Horton atípica: Moderado o intenso engrosamiento intimal de la pared arterial y fibrosis de la media. Infiltrado inflamatorio menos denso

que en la anterior con células gigantes multinucleadas ocasionales o ausentes. Es una situación intermedia entre el tipo anterior y el siguiente.

c) Arteritis de Horton cicatricial: Estas arterias tenían un engrosamiento intimal irregular con fibrosis de la íntima y también de la media. El infiltrado inflamatorio crónico era escaso y focal y existía rotura de la lámina elástica. El término de arteritis de tipo cicatricial debe ser entendido como meramente descriptivo y no en un sentido evolutivo puesto que no está claro su significado cronológico.

II.4. SUEROS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los sueros específicos y los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio se resumen en la tabla 9.

II.5. METODO DE LA AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA.

El estudio de la S-100 y la lisozima se efectuó en secciones histológicas del material fijado en formol e incluido en parafina mediante el método inmunoenzimático indirecto del complejo avidina-biotina-peroxidasa (310 bis) (Vector). Los distintos pasos del método se resumen en la tabla 10. Se obtuvieron secciones de 5 micras que se desparafinaron en xilol e hidrataron en alcoholes decrecientes. El bloqueo de la peroxidasa

TABLA 9: SUEROS ESPECÍFICOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.

ANTICUERPO	CD	ANTÍGENO	PROCEDENCIA	DILUCIÓN UTILIZADA	ESPECIFICIDAD
CD1-S-100*		S-100	Dako	1/1000	Células presentadoras de antígeno**
CD1-6	CD1	43-49 Kd	Beckton-Dickinson	1/10	Células de Langerhans. Timocitos
CD1-12	CD19	95 Kd	Beckton-Dickinson	1/10	Pan-B
CD1-15	CD22	135 Kd	Dako	1/10	Pan-B
CD1-4	CD3	25,20 Kd	Beckton-Dickinson	1/50-100	Pan-T
CD1-3a	CD4	55 Kd	Beckton-Dickinson	1/50-100	Subpoblación T-colaboradora
CD1-2a	CD8	34 Kd	Beckton-Dickinson	1/50-100	Subpoblación T-supresora (citotóxica)
CD1-7		NKH-1	Beckton-Dickinson	1/10	Células con actividad K y NK
CD1-1			Dr. Vilella HCP	1/1000-3000	Antígenos clase II HLA-DR
CD1-TAC	CD25	55 Kd	Beckton-Dickinson	1/20	Receptor interleukina-2
CD1-11			Dako	1/50	Histiocitos y monocitos
CD1-lisozima*			Dako	1/200	Histiocitos y monocitos

* Sueros polivalentes.

** En tejidos extralinfoides está presente en otros tipos celulares.

TABLA 10: METODO DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA (ABC).

1. Desparafinar en xilol.	
2. Bloqueo de la peroxidasa endógena con metanol-H ₂ O ₂ 20%	20 minutos
3. Hidratar en alcoholes decrecientes	
4. Suero normal de cabra 20%	30 minutos
5. Suero primario 4°C	16-24 horas
6. Lavado en PBS x 3	10 minutos
7. Suero puente biotinilado	30 minutos
8. Lavado en PBS x 3	10 minutos
9. Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa	30 minutos
10. Revelado DAB	2-7 minutos
11. Tinción HE, aclarado y montaje	

endógena se efectuó con metanol-agua oxigenada al 20% tras el lavado del xilol utilizado en la extracción de la parafina con alcohol absoluto y previamente a los pasos de hidratación progresiva. El tiempo utilizado para el bloqueo fue de 30 minutos. Tras la hidratación completa se procedió a una incubación con suero normal de cabra al 20% diluido en tampón fosfato salino (PBS) para disminuir la unión inespecífica del suero puente utilizado en el proceso. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente se procedió a decantar el exceso del suero para continuar con la incubación de los antisueros específicos obtenidos en conejo anti-S-100 y anti-lisozima a unas diluciones de 1/1000 y 1/200 respectivamente. Estas diluciones eran las consideradas óptimas en exámenes previos realizados en tejidos control (ganglio linfático) para conseguir el máximo de señal específica y mínimo de tinción de fondo. La incubación con estos sueros se efectuó en cámara húmeda a 4°C durante 16-24 horas seguidas de una hora a temperatura ambiente. Se efectuaron tres lavados con PBS durante diez minutos y se continuó con el suero de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo biotinilado preparado según las recomendaciones del fabricante (Vector Ltd). Esta incubación se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras un lavado similar al anterior se procedió a la incubación durante 30

minutos con el complejo avidina-biotina-peroxidasa preparado 30 minutos antes de su uso. Después de tres lavados durante diez minutos con el tampón Trizma 0'05M pH 7'6-7'8 (Sigma) se procedió al revelado de la peroxidasa con 3-3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB). Se disolvían 5 mgr. de DAB (Fluka) en 10 ml. de Trizma con H₂O al 0'1%. Se filtraba y se revelaban las secciones histológicas bajo control microscópico para conseguir el máximo de señal específica con el mínimo de tinción de fondo. El tiempo de revelado oscilaba habitualmente entre 2 y 17 minutos.

Posteriormente las secciones se teñían ligeramente con hematoxilina de Hill, se deshidrataban en alcoholes crecientes, se aclaraban en xilol y se montaban en DPX.

II.6. METODO DE LA FOSFATASA ALCALINA ANTI-FOSFATASA ALCALINA.

El método inmunoenzimático indirecto de la fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina (133) fue utilizado para demostrar la reactividad de los diversos anticuerpos monoclonales sobre secciones histológicas del material congelado. El método se resume en la tabla 11.

TABLA 11: METODO DE LA FOSFATASA ALCALINA ANTI-FOSFATASA

ALCALINA (FAAFA).

1. Fijar en acetona a 4°C	10 minutos
2. Dejar secar	
3. Suero normal de conejo 20% en PBS	30 minutos
4. Anticuerpo monoclonal	1 hora
5. Lavado en PBS x 3	10 minutos
6. Suero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón 1/20 en PBS	30 minutos
7. Lavado en PBS x 3	10 minutos
8. Complejo FAAFA	30 minutos
9. Lavado en PBS y Tris	10 minutos
10. Revelado	15-20 minutos
11. Tinción con Hematoxilina y montaje en medio hidrosoluble.	

Las arterias congeladas se cortaban a 5-7 micras en un criostato a -20°C . Las secciones recogidas en portas gelatinizados se dejaban secar durante 16-24 horas a temperatura ambiente antes de iniciar la técnica inmunohistoquímica.

Una vez secos los cortes se fijaban en acetona fría a 4°C durante 10 minutos. De nuevo se dejaban secar a temperatura ambiente y se procedía a la incubación con suero normal de conejo (SNC) al 20% (Dakopatts) durante 30 minutos para inhibir la unión inespecífica del antisuero secundario o antisuero puente. Transcurrido este tiempo las preparaciones se decantaban para eliminar el exceso del SNC y sin dejarlas secar se incubaban con el anticuerpo monoclonal diluido en PBS a las diluciones expresadas en la tabla 9. El tiempo de incubación era de una hora. Posteriormente se procedía a un lavado en PBS con tres cambios durante 10 minutos en agitación continua. Sin permitir la desecación se incubaban con suero de conejo antiinmoglobulinas de ratón a una dilución 1/20 en PBS durante 30 minutos. Se repetía el lavado como en el paso anterior y se incubaban las preparaciones con el complejo fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina (FAAFA) (Dakopatts) diluido a 1/75 en PBS durante 30 minutos.

Tras un lavado en PBS y posteriormente en tampón TRIS 0'1M pH 8'2 se procedía al revelado.

El substrato se preparaba momentos antes de su uso según el método siguiente:

1.- Disolver 2 mg. de Naftol-AS-MX fosfato (Sigma) en 0'2 ml. de Dimetilformamida (Merck) en tubo de vidrio.

2.- Añadir 9'8 ml. de tampón TRIS 0'1M pH 8'2.

3.- Disolver 10 mg. de FAST RED TR (Sigma).

4.- Añadir 2'4 mgr. de Levamisole (Sigma) a la solución anterior para inhibir la fosfatasa alcalina endógena.

Esta solución se filtraba antes de su uso para eliminar los agregados e impurezas.

La incubación de las secciones con la solución de substrato se efectuaba bajo control microscópico durante 15-20 minutos. Tras un lavado se teñían ligeramente con hematoxilina de Harris y se montaban en el medio hidrosoluble permanente glicergel (Dakopatts).

II.7. METODO DE GRADACION DE LOS RESULTADOS.

La reactividad de los distintos antisueros y anticuerpos monoclonales fue evaluada semicuantitativa-

mente de 0 a 4. Los casos sin ninguna célula positiva fueron considerados negativos. El grado 1 o reactividad ocasional fue asignado a aquellos casos donde podían verse algunas células positivas aisladas distribuidas irregularmente en la pared arterial pero sin llegar a formar grupos. El grado 2 o reactividad focal se estableció en los casos donde las células positivas formaban pequeños grupos distribuidos irregularmente en la pared arterial pero sin llegar a fusionarse entre ellos. Estos grupos ocupaban siempre menos del 25% de la circunferencia arterial. El grado 3 o reactividad intensa se consideró en los casos donde los grupos de células positivas se fusionaban entre sí y ocupaban un 25-50% de la circunferencia arterial. El grado 4 o reactividad muy intensa se estableció en aquellos casos donde la celularidad positiva formaba grupos y ocupaba más de un 50% de la circunferencia arterial.

III.- ANALISIS ESTADISTICO.

III.1.- ESTUDIO INMUNOGENÉTICO.

El análisis estadístico del estudio inmunogenético se ha llevado a cabo según la metodología utilizada y recomendada por Tiwari y Terasaki (579).

La asociación entre una enfermedad y el sistema HLA se estudia mediante la comparación de las frecuencias de los distintos antígenos encontradas en un grupo de pacientes no consanguíneos y las objetivadas en una población control numerosa constituida por individuos sanos de la misma etnia no relacionados familiarmente entre sí. Si la frecuencia de un antígeno está significativamente aumentada o disminuida en los pacientes respecto a la población control, la enfermedad se considera asociada al antígeno en estudio.

El análisis respecto a cada antígeno parte de una tabla simple 2×2 que contiene el número de individuos positivos y negativos para el antígeno en el grupo de pacientes (a y b) y en el grupo control (c y d).

La incidencia relativa, denominada también riesgo relativo, se calcula según la fórmula definida por

$$\text{Woolf (626):} \quad \text{ad}$$

$$\text{RR= } \frac{ad}{bc}$$

e indica cuantas veces es más frecuente la enfermedad en los individuos que poseen el antígeno, respecto a los que no lo tienen.

Cuando la totalidad de los pacientes son portadores del antígeno valorado ($b=0$), situación nada excepcional al estudiar colectivos de pacientes con una enfermedad estrechamente asociada al sistema HLA como por ejemplo la espondiloartritis anquilosante y el antígeno B-27 o la narcolepsia y el antígeno DR2; o cuando ningún paciente en el grupo control posee el antígeno ($c=0$), el RR según la fórmula de Woolf es indefinido. Por este motivo, para valores de a , b , c o d de 0 ó pequeños, se utiliza la modificación de Haldane (579) según la cual:

$$\text{RR= } \frac{(2a+1)(2d+1)}{(2c+1)(2b+1)}$$

Si las relaciones a/b y c/d son similares, el RR es próximo a la unidad. Será mayor que 1 si el antígeno es más frecuente en los pacientes y menor que 1 en la situación inversa. La significación estadística de

la diferencia entre el RR y la unidad se calcula mediante un test de chi-cuadrado con un grado de libertad. El nivel de significación se expresa en términos de probabilidad (p). Como es habitual en los datos biológicos se acepta como significativa una p menor que 0'05.

Sin embargo, en este tipo de estudios, en cada individuo se estudian varios antígenos. A causa de las comparaciones múltiples es muy probable que algunas frecuencias antigénicas difieran de la población control con una $p < 0'05$ sólo por azar. Este error se subsana mediante la aplicación de la corrección de Bonferroni que consiste en multiplicar el valor p obtenido por el número de antígenos comparados. Si la p corregida (p corr) sigue inferior a 0'05, el antígeno se considera significativamente asociado a la enfermedad. Otra posibilidad es realizar un nuevo estudio sobre la misma enfermedad con pacientes distintos y estudiar únicamente los antígenos significativamente asociados en el primer estudio. Si en el nuevo análisis la p sigue inferior a 0'05, la asociación se considera válida puesto que en este estudio no se hace una comparación múltiple sino que se estudian específicamente antígenos concretos. Atendiendo a estos conceptos, en nuestro trabajo no realizamos la corrección de

la p cuando efectuamos comparaciones entre subgrupos de la enfermedad.

En una población en equilibrio de Hardy-Weinberg la frecuencia con que 2 alelos correspondientes a 2 loci distintos se transmiten juntos, equivalen al producto de sus frecuencias génicas individuales. Si la frecuencia con que ambos antígenos se transmiten juntos es superior o inferior a la esperada, ambos alelos se hallan en desequilibrio de asociación positivo o negativo respectivamente. La medida del desequilibrio de asociación se representa mediante el símbolo δ que equivale a la diferencia entre la frecuencia hallada y la frecuencia esperada (producto de las frecuencias génicas). La frecuencia génica (g) se calcula:

$$g = \sqrt{1-f}$$

siendo f la frecuencia observada para cada antígeno.

Y el valor δ :

$$\delta = H/10.000 - g_1 \times g_2 \times N$$

siendo g_1 y g_2 las frecuencias génicas respectivas de cada alelo y H la frecuencia con que estos alelos se observan juntos en la población estudiada, expresada en tanto por 10.000 y N el número de individuos estudiados. La significación estadística de esta diferencia se evalúa mediante el test de chi-cuadrado. Atendiendo

a los valores representados en las tablas 2 x 2 para el cálculo de chi-cuadrado, el valor δ se calcula:

$$\delta = \sqrt{d/N} - \sqrt{(b+d)/N^2}$$

La comparación entre la presencia de determinados antígenos y otros parámetros (presencia de factores reumatoides, CIC, necesidad de tratamiento a largo plazo) se evaluó mediante el test de chi-cuadrado.

III.2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.

Las comparaciones entre datos cuantitativos se han realizado mediante el test de Mann-Whitney (166 bis).

El análisis de los datos cualitativos se ha llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher (166 bis).

R E S U L T A D O S

I.- ESTUDIO IMMUNOGENETICO.

I.1.- ASPECTOS CLINICOS.

De los 65 pacientes estudiados, 17 (26%) eran varones y 48 (74%) mujeres. La relación mujer/varón fue aproximadamente de 3:1 (figura 5). La media de edad al ser diagnosticados fue de 71 años (59a-85a). La distribución de edades por décadas aparece en la figura 6. El 78% de los pacientes se hallaban entre los 65 y los 80 años en el momento del diagnóstico.

Las principales manifestaciones clínicas de los pacientes aparecen resumidas en la figura 7 y en las tablas 12 y 13. Sesenta y cuatro de los 65 pacientes (98'5%) presentaban algún tipo de manifestación craneal. De entre ellos, los síntomas subjetivos más frecuentes fueron cefalea (80'6%), claudicación mandibular (53'3%), hiperestesia del cuero cabelludo (38'3%), odinofagia (20%), otalgia (18'3%) y algias faciales. Más rara fue la presencia de edema facial (8'3%), carotidinia (8'3%), dolor o isquemia lingual (6'6%), odontalgia (3'3%) que en un caso motivó la extracción de varias piezas dentarias y trismus (1'6%). Dos pacientes (3%) presentaron manifestaciones neurológicas relacionables con la existencia de isquemia vertebral-basilar (ataxia y vértigo). Uno de ellos sufrió

DISTRIBUCION POR SEXOS

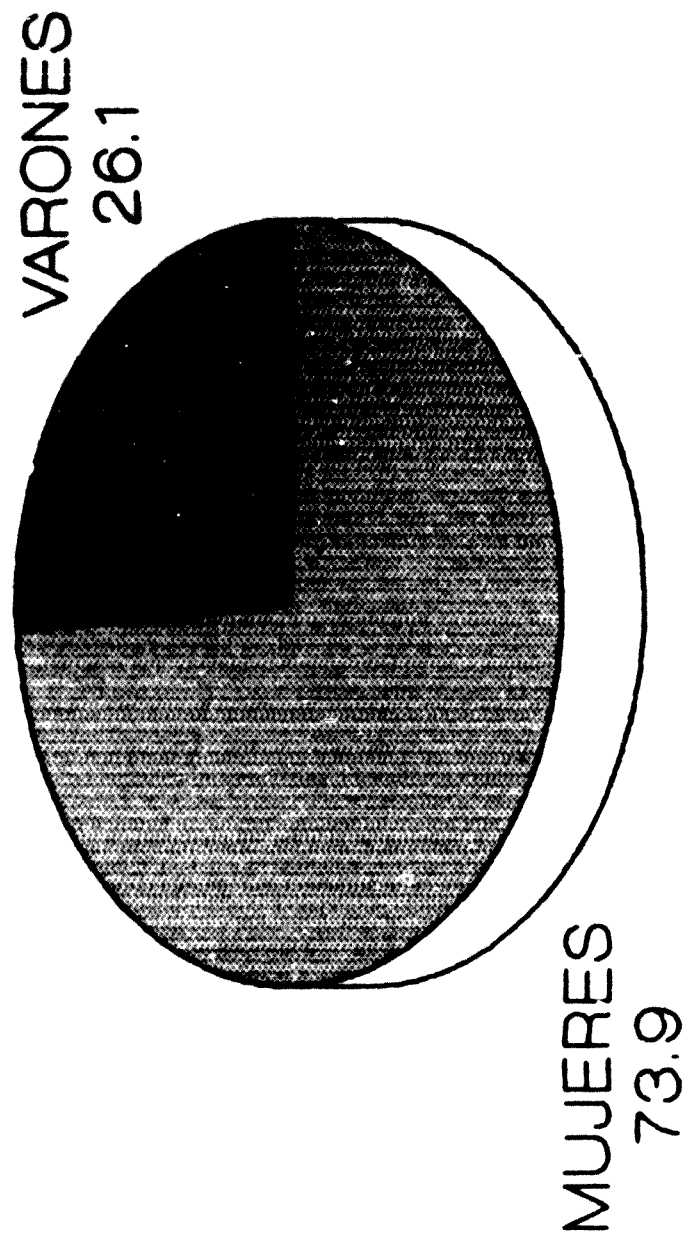


fig 5

DISTRIBUCION POR EDADES

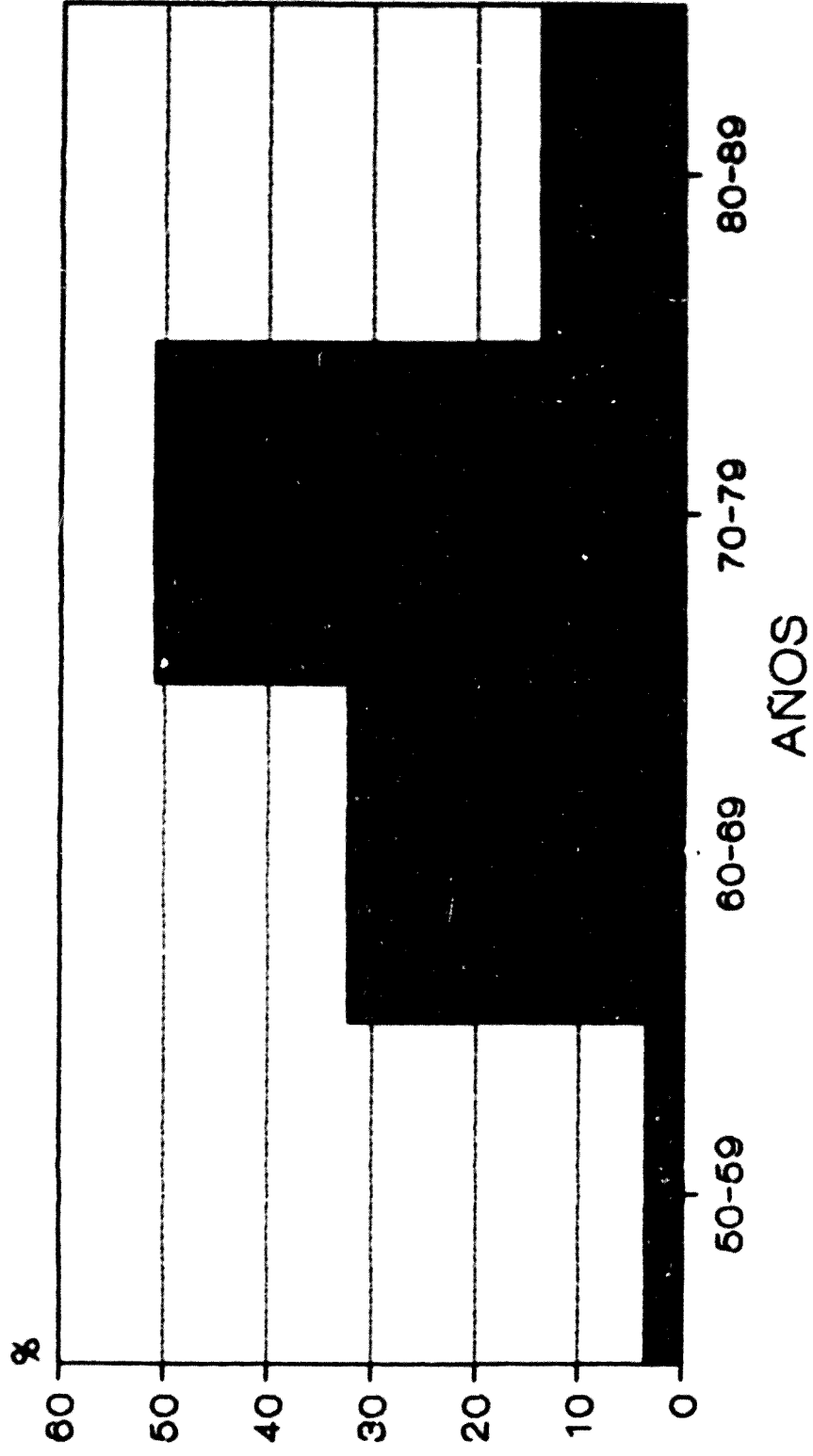


fig 6.

MANIFESTACIONES CLINICAS

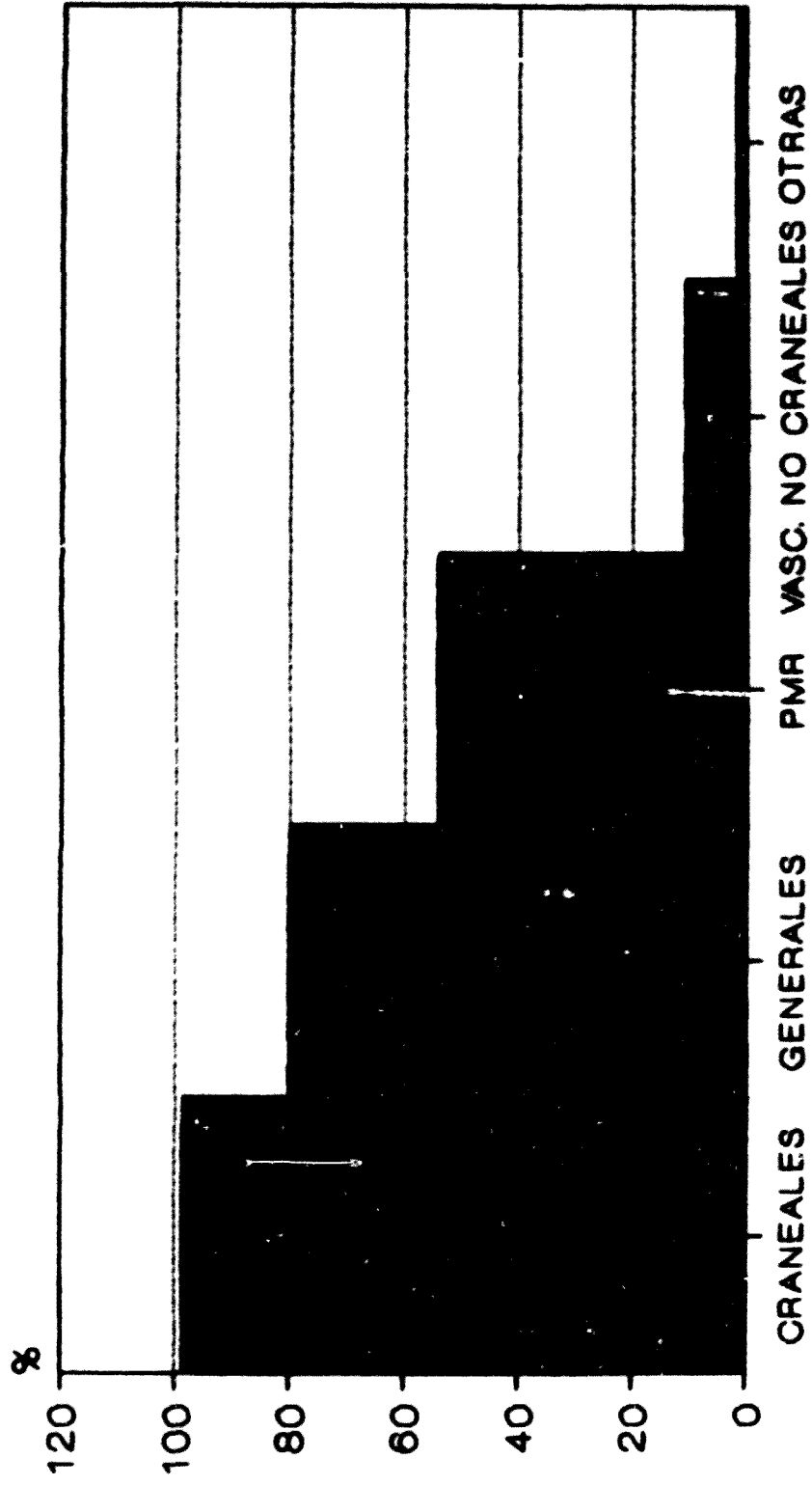


fig 7

TABLA 12: MANIFESTACIONES CLÍNICAS (I) (N=65)

MANIFESTACIONES CRANEALES	98,5%
Arterias temporales anómalas	90%
Cefalea	80,6%
Claudicación mandibular	53,3%
Heperestesia del cuero cabelludo	38,3%
Alteraciones oculares	30,8%
Odinofagia	20%
Otalgia	18,3%
Algias faciales	15%
Edema facial	8,3%
Carotidinia	8,3%
Dolor o isquemia lingual	6,6%
Odontalqia	3,3%
Vértigo	3,3%
Ataxia	1,6%
Trimus	1,6%
Isquemia cerebral transitoria	1,6%

TABLA 13: MANIFESTACIONES CLÍNICAS (II) (N=65)

MANIFESTACIONES GENERALES	79,7%
PÉRDIDA PONDERAL	62,3%
FIEBRE	52,3%
DEPRESIÓN	16,6%
POLIMIALGIA REUMÁTICA	53,8%
APECCIÓN OTROS VASOS	12,3%
ANEURISMA AÓRTICO	4,6%
CLAUDICACIÓN INTERMITENTE EEII	7,7%
OTROS	
POLINEURITIS	1,6%

asimismo episodios de isquemia cerebral transitoria correspondientes al territorio carotídeo. Todas estas manifestaciones desaparecieron al remitir la enfermedad. Un 30'8% de los enfermos tuvieron alteraciones oculares (tabla 14). Tres de ellos (4'6%) presentaron intenso dolor orbitario como equivalente de cefalea que en un caso llegó a ser incluso interpretado como herpes zoster oftálmico y en 2 (3%) existía epífora. Otros 2 pacientes (3%) presentaron diplopia transitoria y otros 2 (3%) amaurosis fugax. Once (17%) de los enfermos sufrieron algún tipo de déficit visual permanente: 3 (4'6%) defectos campimétricos, 4 (6%) amaurosis unilateral y 4 (6%) amaurosis bilateral. En todos ellos la causa fue una neuritis isquémica anterior y en uno de ellos una trombosis de la arteria central de la retina. Los pacientes con defectos visuales permanentes presentaron fiebre con menor frecuencia (18%) que el resto (68%) ($p < 0'01$). Asimismo presentaron pérdida de peso con menos frecuencia (27'3%) que los pacientes sin pérdida de visión (70%) ($p < 0'01$).

En el 90% de los casos existían anomalías a la exploración física cuidadosa de las arterias temporales: endurecimiento, disminución, asimetría o ausencia de pulso, signos inflamatorios o nódulos. En 1 caso las alteraciones eran más evidentes en las arterias

TABLA 14: ALTERACIONES OCULARES (N=15).

Dolor orbitario	20%
Epífora	13,3%
Diplopia	13,3%
Amaurosis fugax	13,3%
Defecto campimétrico	20%
Amaurosis unilateral	26,6%
Amaurosis bilateral	26,6%

occipitales y en otro la mayor parte de arterias epicraneales se hallaban engrosadas de manera llamativa.

Existían manifestaciones generales en un 79'7% de los pacientes: fiebre o febrícula en el 52'3%, pérdida de peso en el 62'3% y depresión en el 16'6%. Treinta y cinco pacientes (53'8%) presentaban PMR. Diez de ellos obtuvieron una puntuación igual o superior a 3 según el score preestablecido. En ellos, pues, la PMR se consideró severa y en el resto ligera-moderada. La presencia de PMR fue significativamente más frecuente en las mujeres (62'5%) que en los varones (29'4%) ($p < 0'02$).

En cuanto a la afección de otros vasos, en 3 pacientes (4'6%) se observó el desarrollo de un aneurisma aórtico, en 7 (10'7%) claudicación intermitente de las extremidades inferiores, aunque únicamente en 5 de éstos (7'7%) se constató un curso paralelo a la actividad de la enfermedad. En el momento del diagnóstico 3 de los pacientes (4'6%) sufrieron manifestaciones cardíacas (angor, infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva). La relación de esta sintomatología con la afección arterítica de las arterias coronarias no pudo demostrarse ni excluirse. Una paciente desarrolló afección al sistema nervioso

periférico en forma de polineuropatía mixta sensitivo-motora.

El protagonismo de las manifestaciones descritas dentro del cuadro clínico de cada paciente fue muy variable. Casi el 100% de los pacientes presentó alguna de las anomalías craneales clásicas de la enfermedad pero en ocasiones éstas eran tan sutiles que sólo las reveló un interrogatorio dirigido. Así, sólo el 68% de los pacientes consultó por síntomas craneales clásicos, en un 9'7% combinados con PMR. Un 14'5% lo hizo por manifestaciones generales, entre ellos un 6'5% por fiebre. Un 8% de los pacientes aquejaban fundamentalmente PMR. Un 9'7% consultó por motivos menos frecuentes: bien por manifestaciones inusuales de la enfermedad (2 pacientes por isquemia vertebro-basilar y 1 por claudicación intermitente de extremidades inferiores), bien por manifestaciones relacionables con reservas (1 insuficiencia cardíaca congestiva y 1 infarto agudo de miocardio) o por otras causas (1 pielonefritis aguda) (figura 8).

En el momento de ser evaluados, 28 pacientes se encontraban en actividad, 21 en remisión y 16 fueron considerados de larga evolución. En 8 se realizaron extracciones en el período de actividad y posterior-

MOTIVO DE CONSULTA

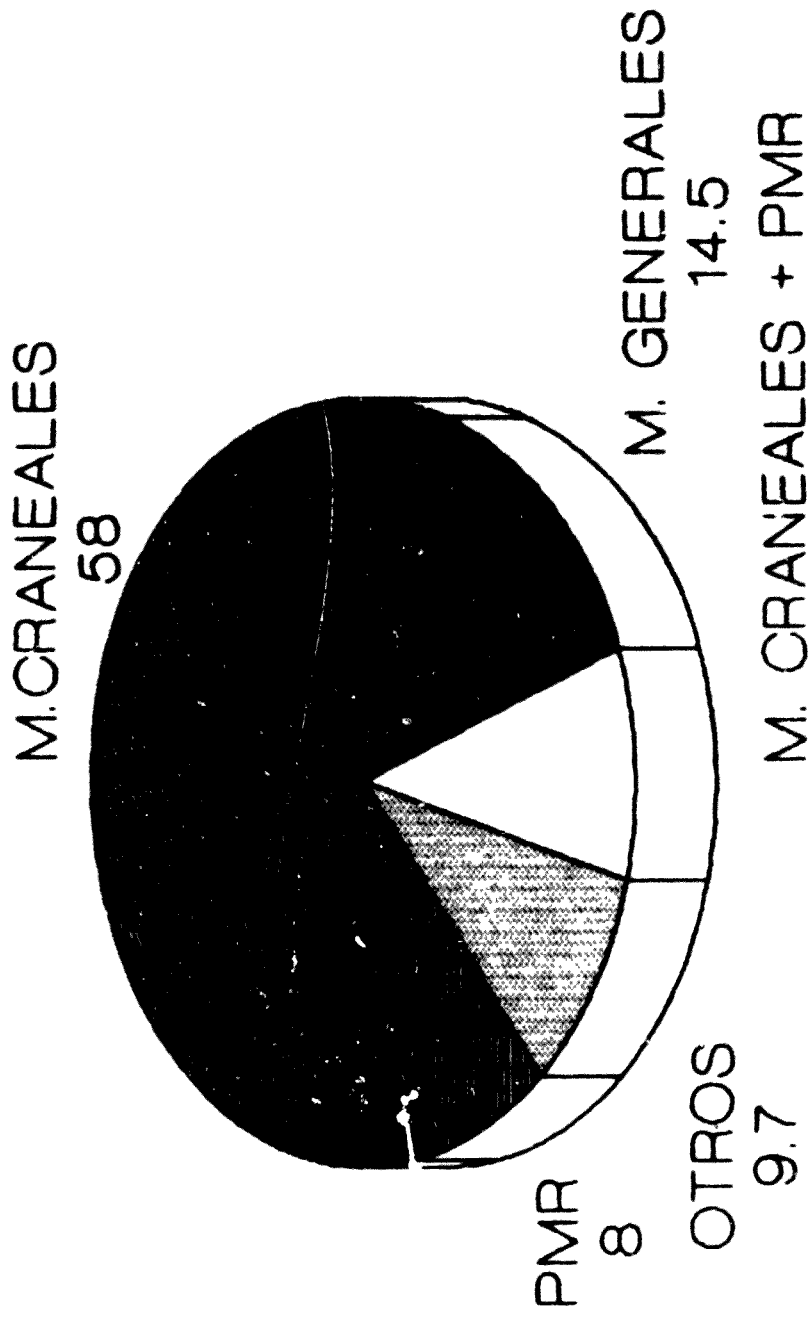


fig 8

mente al alcanzar la remisión. De los pacientes en actividad, 17 no habían recibido tratamiento; los 11 restantes habían sido tratados durante una media de 4'5 días (1-9 días). Todos ellos recibían dosis de prednisona de 1 mg/Kg/día. Los pacientes en remisión habían sido tratados durante una media de 10'5 meses (0'5 a 30 meses). De ellos, 7 recibían dosis de prednisona superiores a 30 mg., 6 entre 15 mg-30 mg, 15 inferiores a 15 mg y 1 no recibía el tratamiento. Los enfermos de larga evolución llevaban una media de 6 años (3 años-12 años) de seguimiento. De ellos, 10 ya no recibían tratamiento, 5 recibían dosis inferiores a 15 mg y 1 recibía todavía 20 mg de prednisona.

I.2.- ANTIGENOS DE CLASE I (A, B, C).

La distribución de los antígenos de clase I en los 65 pacientes y en la población control se exponen en las tablas 15, 16 y 17. No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de ninguno de los antígenos correspondientes al locus A ni al locus C. El antígeno B44 se detectó en el 18'5% de los pacientes frente al 31'5% de los controles ($p < 0'05$). Sin embargo, al efectuar la corrección de Bonferroni la diferencia no fue significativa. Tampoco se observó ninguna relación entre los antígenos analizados y las manifestaciones clínicas valoradas (amaurosis, PMR,

TABLA 15: ANTÍGENOS DE CLASE I (LOCUS A) EN LA AH (%).

	AH (N=65)	PMR (N=34)	no PMR (N=31)	CONTROL (n=200)
A1	18,5	20,5	16	19,5
A2	47,5	50	45	45,5
A3	21,5	29,5	13	17
A9	0	0	0	0,5
A11	14	12	16	14,5
A19	0	0	0	0,5
A23	4,5	9	0	5,5
A24	17	6	29	18
A25	6	9	3	3,5
A26	9	6	13	10,5
A28	1,5	0	3	7,5
A29	23	24	22,5	19,5
A30	4,5	3	6,5	10,5
A31	3	3	3	4,5
A32	6	6	6,5	5
A33	6	6	6,5	2

TABLA 16: ANTÍGENOS DE CLASE I (locus B) en la AH (%)

	AH (N=65)	PMR (N=34)	no PMR (N=31)	CONTROL (N=200)
B5	1,5	3	0	1
B7	12,5	12	13	16
B8	17	24	9,5	10,5
B12	0	0	0	1
B13	7,5	9	6,5	4,5
B14	11	14,5	6,5	13,5
B18	18,5	14,5	22,5	1
B21	0	0	0	1
Bw22	0	0	0	2
B27	6	3	9,5	4,5
B35	12,5	9	16	18
B37	3	3	3	5
B38	7,5	6	9,5	4
B39	1,5	0	3	5
Bw41	0	0	0	2,5
B44 ^x	18,5	26,5	13	31,5
B45	4,5	0	0	0
Bw47	0	0	0	0,5
Bw49	7,5	9	6,5	12,5
B50	6	6	6,5	7,5
B51	15,5	20,5	9,5	13
Bw52	0	0	0	2
Bw53	1,5	0	3	1,5
Bw55	1,5	3	0	1
Bw57	4,5	0	9,5	6,5
Bw58	1,5	0	3	0,5
Bw60	1,5	3	0	6
Bw61	0	0	0	2
Bw62	9	9	9,5	4,5
Bw63	0	0	0	1,5

^x p < 0,05; p corr NS

TABLA 17: ANTÍGENOS de clase I (locus C) en la AH (%)

	AH (N=62)	PMR (N=38)	no PMR (N=29)	C (N=200)
Cw1	6,5	0	14	4,5
Cw2	9,5	12	7	4,5
Cw3	13	9	17	13
Cw4	16	18	14	24
Cw5	14,5	21	7	9
Cw6	13	6 [*]	24 [*]	18
Cw7	3	3	0	2
Cw8	0	0	0	0,5

^{*} PMR vs no PMR $p < 0,05$ p corr NS:

síntomas constitucionales o afección de otros vasos). El antígeno Cw6 se observó en el 24% de los pacientes sin PMR y sólo en el 6% de los pacientes con PMR ($p < 0'05$). Sin embargo, tras realizar la corrección, esa diferencia tampoco fue significativa.

I.3.- ANTIGENOS DE CLASE II (DR Y DQ).

La distribución de DR y Dde los antígenos DR y DQ en los 65 pacientes estudiados se expone en la tabla 18.

El antígeno DR4 fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con AH (40%) que en el grupo control (20%) ($p_{corr} < 0'05$; RR 2'66). Contrariamente la prevalencia de DQ2 fue significativamente inferior en el grupo de pacientes (23%) respecto al grupo control (49%) ($p_{corr} < 0'03$; RR 0'31).

Al analizar los datos clínicos se observó que la asociación con el antígeno DR4 era más estrecha en los pacientes con PMR (58'8% versus 20%); $p_{corr} < 0'001$; RR 5'71); la prevalencia de DR4 en estos enfermos (58'8%) era significativamente mayor a la obtenida en los pacientes sin PMR (19'3%) ($p < 0'005$; RR 5'95) que no difería de la objetivada en la población control (tabla 18).

TABLA 18: ANTÍGENOS DE CLASE II (DR y DQ) en la AH (%).

	AH (N=65)	PMR (N=34)	no PMR (N=31)	CONTROL (N=200)
DR1	20	23,5	16,1	19,5
DR2	20	11,7	29	17
DR3	33,8	32,3	35,4	24
DR4	40 ^(*)	58,8 ^(**)	19,3	20
DR5	24,6	17,6	32,2	29,5
DR6	9,2	5,8	12,9	9,5
DR7	24,6	26,4	22,5	36
DR8	3	5,8	0	0
DR9	1,5	2,9	0	3
DR10	4,6	5,8	3,2	5
DRw52	63	58,8	67,7	67,5
DRw53	47,6	58,8	35,4	50
DQ1	43	35,2	51,6	55,5
DQ2	23 ^(***)	23,5 ^(***)	22,5 ^(***)	49
DQ3	47,6	52,9	41,9	44,5

(*) $p < 0,005$, p corr $< 0,05$, RR 2,66 vs controles.

(**) $p < 0,001$, p corr $< 0,001$, RR 5,71 vs controles.
 $p < 0,005$, RR 5,95 vs AH sin PMR

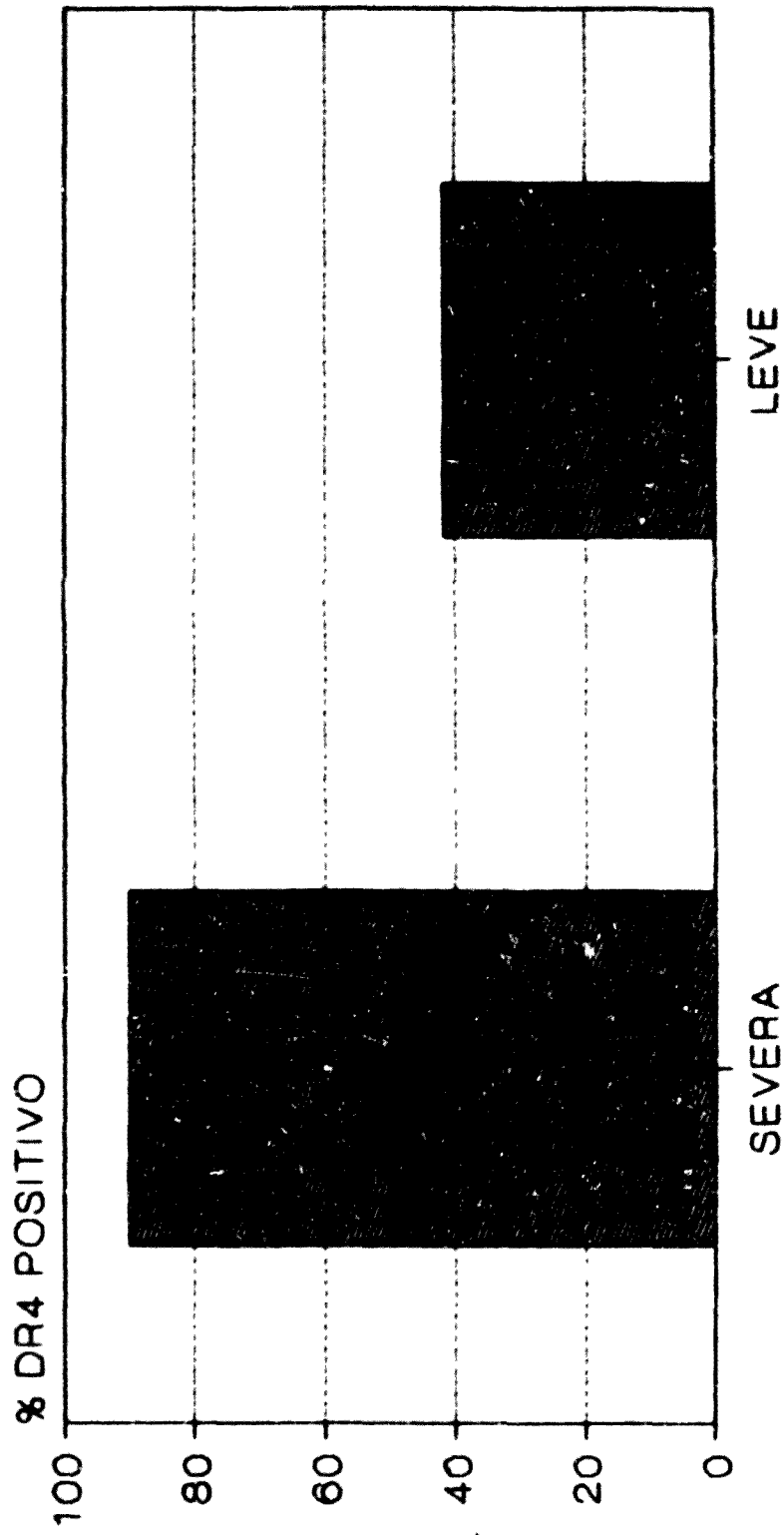
(***) $p < 0,001$, p corr $< 0,003$, RR 0,31 vs controles.

El antígeno DR4 estuvo presente en 9 de los 10 pacientes con PMR severa (90%). Esta frecuencia fue significativamente superior a la hallada en los pacientes con síntomas moderados (41'6%) ($p < 0'05$) (figura 9). Al valorar la agresividad de la AH en base a la necesidad de tratamiento a largo plazo (más de 3 años de evolución), aunque se observó un incremento en la frecuencia de DR4 en los pacientes que todavía precisaban corticosteroides (60%) respecto a los que ya no los recibían (45'5%), esta diferencia no fue significativa.

La disminución de DQ2 objetivada en el grupo total de pacientes se constató de modo equiparable en los pacientes con y sin PMR.

Se observó también un incremento en la frecuencia de DR3 en el grupo global de enfermos y en ambos subgrupos así como una disminución en la frecuencia de DR2 en el subgrupo con PMR respecto al subgrupo sin PMR, pero las diferencias no fueron significativas. Ninguno de los pacientes severamente afectados por la PMR poseía DR2.

DR4 Y SEVERIDAD DE LA PMR



$P < 0.05$
fig 9

El antígeno DRw53 tuvo una mayor prevalencia en los pacientes con PMR respecto al subgrupo sin PMR sin alcanzar, no obstante, significación estadística.

Se constató un discreto aumento en la prevalencia de DR1 en los pacientes con PMR respecto a los que no la tenían (tabla 19). Por este motivo se estudió la prevalencia de DR1 en los pacientes DR4 negativos con y sin PMR. DR1 estuvo presente en 5 (33'3%) de los 15 pacientes con PMR frente a 4 (16'7%) de los 24 enfermos sin PMR. La diferencia no fue, sin embargo, significativa.

Aunque no se demostró un incremento significativo de DR3, la prevalencia de heterocigotos DR3-DR4 fue superior en los pacientes (12%) que en la población control (3'5%) ($p < 0'01$). La frecuencia de enfermos portadores de DR3-DR4 fue todavía superior en los pacientes con PMR (17'6%). En los pacientes sin PMR la prevalencia de DR3-DR4 (6'5%) fue similar a la encontrada en la población control (3'5%) ($p: NS$) (tabla 20). No se observó relación entre ninguno de los restantes antígenos de clase II y las otras manifestaciones clínicas valoradas.

TABLA 19: PREVALENCIA DE DR1 EN PACIENTES DR4 NEGATIVOS (%).

	AH (N=39)	PMR (N=15)	no PMR (N=24)	CONTROL (N=160)
DR1	23	33 ^(*)	16,7	22

(*) p NS.

TABLA 20: PREVALENCIA DE HETEROZIGOTOS DR3-DR4 en la AH (%).

	AH (N=65)	PMR (N=34)	no PMR (N=31)	CONTROL (N=200)
DR3-DR4	12 ^(*)	17,6 ^(**)	6,5	3,5

(*) p < 0,01

(**) p < 0,01

PMR vs no PMR p: NS

I.4.- Desequilibrio de Asociación.

Para estudiar la posible asociación preferente de la enfermedad con algún haplotipo, se estudió la existencia de desequilibrio de asociación entre el antígeno DR4 y antígenos del locus C, B y DQ en el grupo global de pacientes y en los subgrupos con y sin PMR.

El antígeno DR4 apareció asociado débilmente a B62 en el grupo global de pacientes y en ambos subgrupos ($\delta = 0'006$) sin alcanzar significación estadística. Existía un desequilibrio de asociación positivo entre DR4 y DRw53 ($\delta = 0'02$; $p < 0'05$) únicamente en el grupo global de pacientes. Se observó un desequilibrio de asociación negativo entre DR4 y DQ2 en el grupo global de enfermos ($\delta = -0'01$; $p < 0'05$) y en el subgrupo con PMR ($\delta = -0'02$; $p < 0,05$).

I.5.- DETERMINACIONES SEROLOGICAS.

I.5.1.- COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES.

Se realizaron 53 determinaciones en 48 enfermos. 19 pacientes se hallaban en actividad, 18 en remisión y 16 pertenecían al grupo de larga evolución. En 5 pacientes se realizaron dos determinaciones en distintos momentos evolutivos: en 4 en actividad y en remisión; en 1 en remisión y en larga evolución.

Se detectaron CIC en 12 de las 53 determinaciones (22'5%) correspondientes a 10 de los 48 enfermos (21%).

De los 19 pacientes valorados en actividad, 2 (10'5%) presentaron CIC; de los 18 pacientes estudiados en remisión, 6 (33'3%) y de los 16 pacientes de larga evolución, 4 (25%) (tabla 21). Las diferencias entre los 3 grupos no fueron significativas. En los 5 pacientes en que se realizaron 2 determinaciones, tampoco se observó relación con la actividad de la enfermedad: 2 eran negativos y persistieron negativos; 2 fueron positivos y persistieron positivos y en 1, inicialmente negativo, se detectaron al alcanzar la remisión.

De los 10 pacientes con CIC, únicamente 1 era portador del antígeno DR3 y ninguno del haplotipo B8-DR3. Cinco de ellos (50%) eran portadores del antígeno DR4, así como 12 (35'5%) de los 38 pacientes sin CIC. La diferencia tampoco fue significativa.

En 7 (27%) de los 26 pacientes con PMR se detectaron CIC y sólo en 3 (13'6%) de los 22 pacientes sin PMR. La diferencia no fue, sin embargo, significativa.

I.5.2.- FACTORES REUMATOIDES.

Se practicaron 45 determinaciones en 42 pacientes. 20 se hallaban en actividad, 13 en remisión y 12 pertenecían al grupo de larga evolución. En 3 pacientes se realizaron sendas terminaciones en actividad y en remisión.

Se objetivó la presencia de factores reumatoides en 11 de las 45 determinaciones (24'4%), correspondientes a 10 de los 42 enfermos (24%). Los niveles oscilaron entre 20 UI/ml y 80 UI/ml. Unicamente en 2 pacientes (5%) los niveles alcanzaron 80 UI/ml.

Siete (35%) de los 20 pacientes valorados en actividad, 1 (19%) de los 13 pacientes estudiados en remisión y 3 (25%) de los 12 pertenecientes al grupo de larga evolución, poseían factores reumatoides séricos. Las diferencias entre los 3 grupos no fueron significativas (tabla 22). De los 3 pacientes en que se realizaron 2 determinaciones, 1 era negativo y persistió negativo, otro negativo inicialmente se positivizó a valores de 40 UI/ml y el último, positivo a 20 UI/ml cuando se hallaba en actividad se negativizó al alcanzar la remisión.

TABLA 21: CIC EN LA AH SEGÓN LA ACTIVIDAD DE LA

ENFERMEDAD (%)

	ACTIVIDAD (N=19)	REMISIÓN (N=18)	LARGA EVOLUCIÓN (N=16)
CIC PRESENTES	10,5	33,3	25

(*) p:NS

TABLA 22: FR EN LA AH SEGÓN LA ACTIVIDAD DE LA

ENFERMEDAD (%)

	ACTIVIDAD	REMISIÓN	LARGA EVOLUCIÓN
FR POSITIVO	35%	18%	25%

p:NS

La prevalencia del antígeno DR4 en los 10 enfermos con factores reumatoides (40%) y en los 32 pacientes sin ellos (37'5%), fue similar. Tampoco se observaron diferencias en la prevalencia del antígeno DR3.

No se observó correlación entre la presencia de factores reumatoides y complejos inmunes circulantes.

II.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.

II.1.- DIAGNOSTICOS HISTOLOGICOS.

El estudio histológico de las 24 arterias temporales demostró que 18 correspondían a la denominada AH clásica (figura 10) y 6 a la AH "atípica" sin células gigantes o con escaso número de ellas (figura 11) y ninguna a la forma cicatricial. En los casos de AH atípica, el infiltrado inflamatorio tendía a disponerse en la interfase entre la adventicia y la muscular de la arteria. La lámina elástica estaba fragmentada en todos los casos.

Aunque el tiempo de evolución de los síntomas craneales en los enfermos con arteritis de Horton atípica era mayor (x 4'9 meses) que en las que tenían una AH clásica (x 1'77 meses), la diferencia no fue significativa. Tampoco se observó una relación entre el tipo histológico y el hecho de que la biopsia se realizara previa al inicio del tratamiento o una vez ya instaurado.

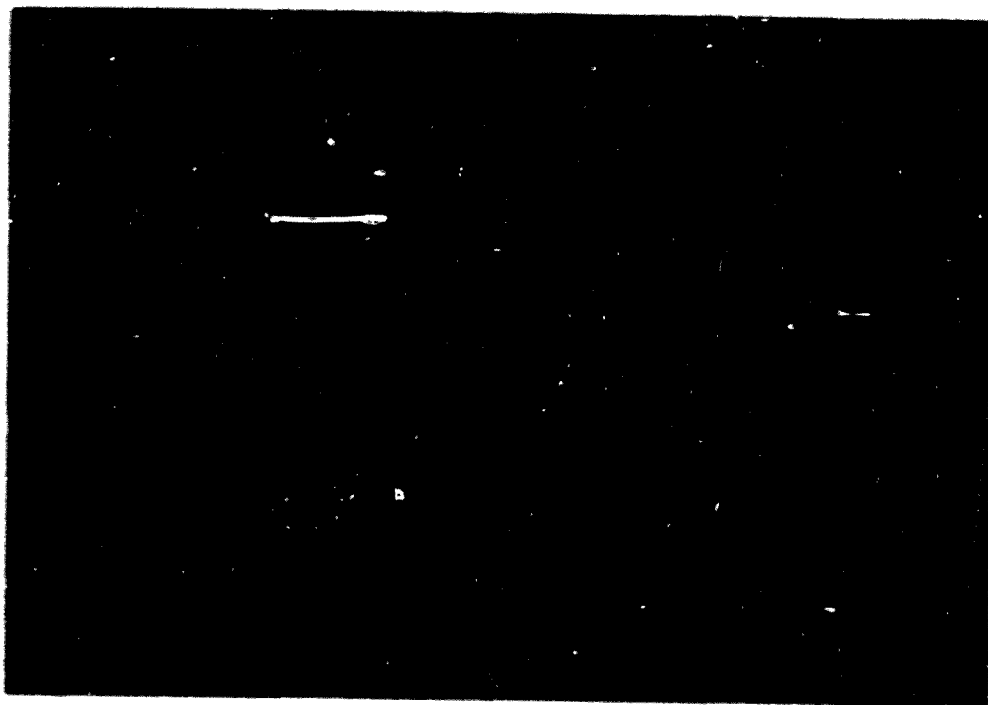


Figura 10.- Arteritis de Horton clásica. Infiltrado inflamatorio intenso que se extiende a las tres capas de la pared con abundancia de células gigantes (Hematoxilina-eosina x 100).

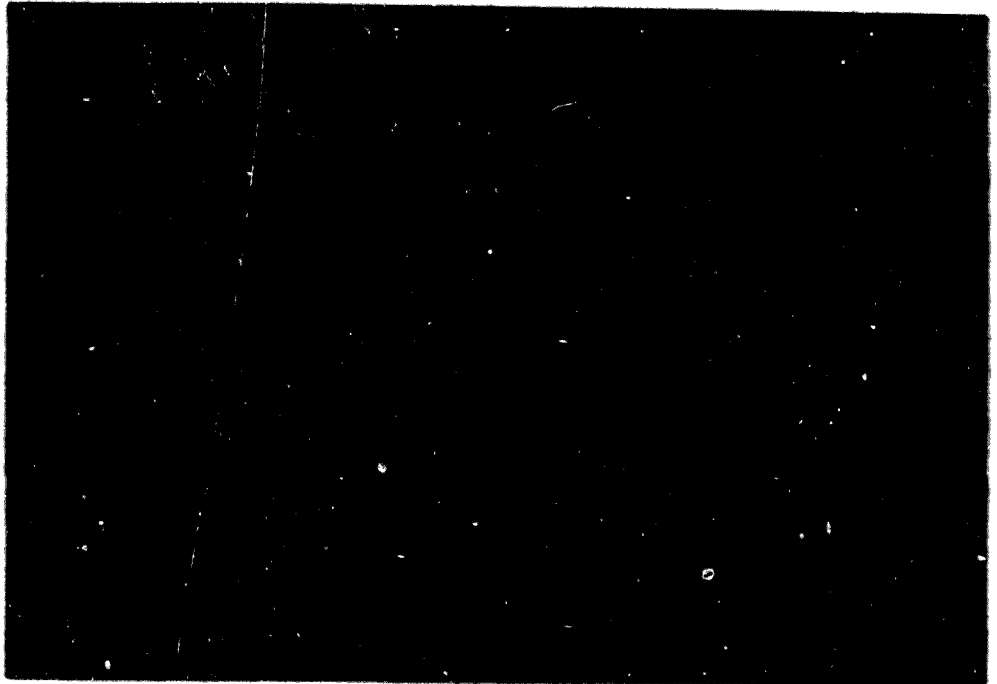


Figura 11.- Artritis de Horton atípica. Infiltrado inflamatorio moderado distribuido principalmente alrededor de la LEI y en la zona adventicial. Ausencia de células gigantes. (Hematoxilina-eosina x 40).

II.2.- POBLACIONES CELULARES.

II.2.1.- CELULAS INTERDIGITANTES.

Las células presentadoras de antígenos se estudiaron mediante la detección de la proteína S-100 en 22 casos y del antígeno CD1 (T6) en 19 casos.

Se detectaron células S-100 positivas en 9 arterias (41%) (figura 12). Estas células se encontraban en el seno de la pared arterial entre las células linfoides e histiocitarias del infiltrado inflamatorio. En algunos casos se veían en la proximidad de las células gigantes y de la lámina elástica interna fragmentada. Las células gigantes multinucleadas fueron siempre negativas para este antígeno. El número de células positivas fue ocasional o focal en todos los casos. El patrón de la tinción fue citoplásmico granular. El contorno de las células era irregular y en algunos casos se podía observar la existencia de finas prolongaciones citoplasmáticas de aspecto dendrítico (figura 13). En ocasiones se pudo observar una íntima relación entre estas prolongaciones dendríticas y linfocitos (figura 14).

No se observó ninguna relación entre la presencia de estas células y el tipo histológico de la AH. Tam



Figura 12.- Inmunorreactividad para la proteína S-100 en un segmento arterial. Ocasionales células positivas en el infiltrado inflamatorio. Las células gigantes multinucleadas son negativas (ABC-hematoxilina x 250).

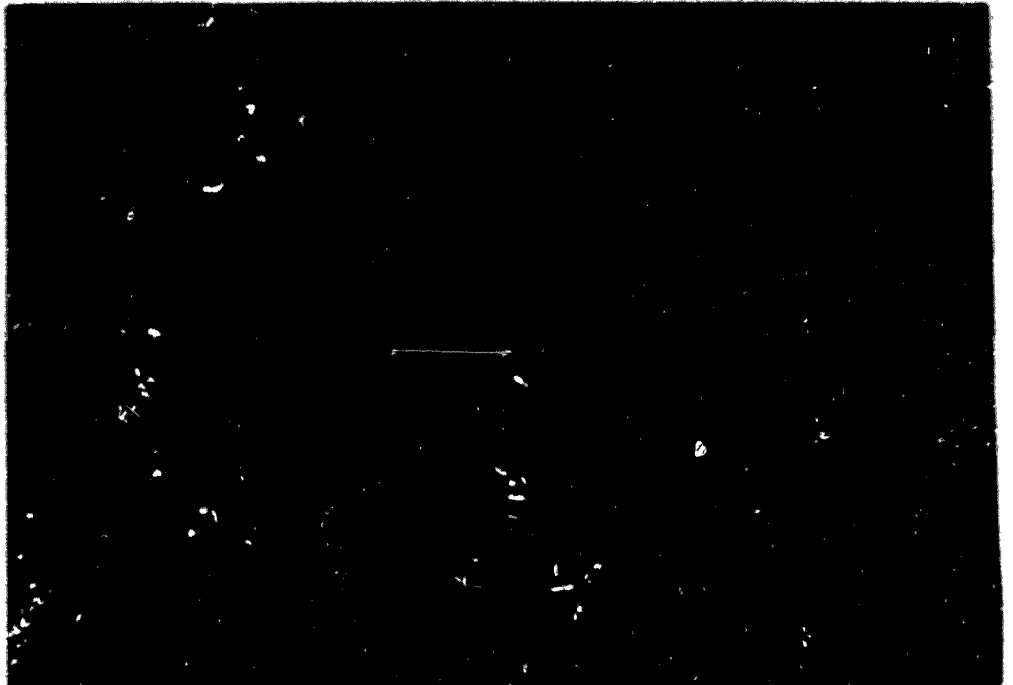


Figura 13.- Aspecto dendrítico de una célula S-100 positiva. (ABC-hematoxilina x 400).

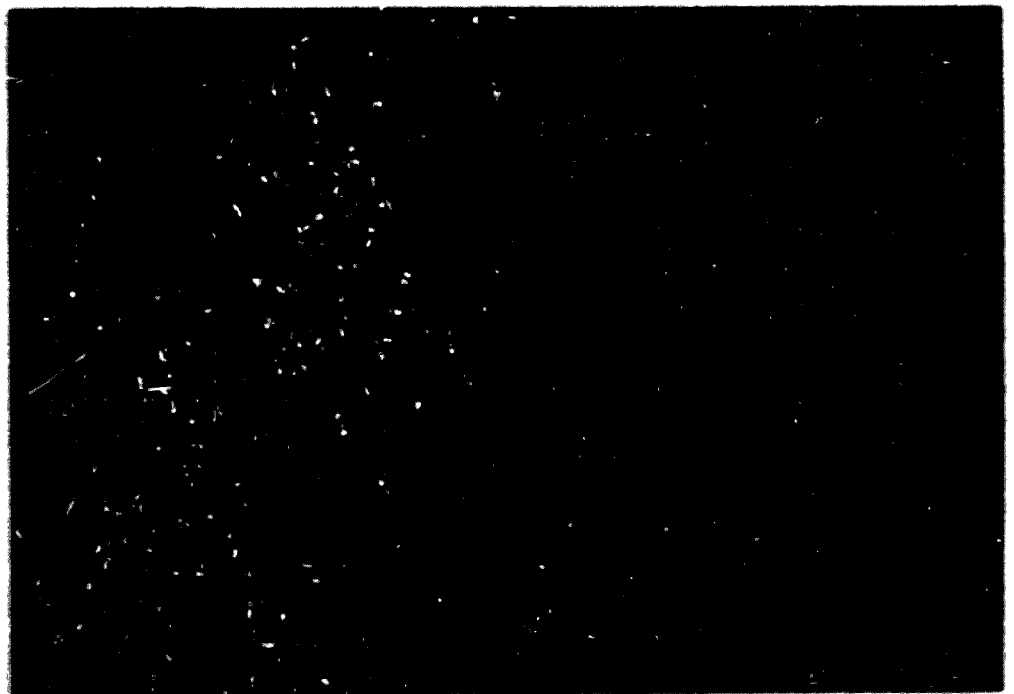


Figura 14.- Célula S-100 positiva que rodea con sus finas prolongaciones citoplasmáticas a varios linfocitos. (ABC-hematoxilina x 400).

poco existía relación entre la existencia de células S-100 positivas y el tratamiento. Por el contrario, si se observó una relación entre la detección de células S-100 inmunoreactivas y el tiempo de evolución de los síntomas craneales de la enfermedad hasta el momento del diagnóstico (tabla 23). La duración media de los síntomas craneales en los casos S-100 positivos fue de 1'5 meses (1 semana-3 meses) mientras que en los casos negativos fue de 3'8 meses (1 mes-18 meses) ($p < 0'05$). La tinción inmunohistoquímica de la proteína S-100 también demostraba la existencia de troncos nerviosos finos en los tejidos adyacentes a la arteria así como en la capa muscular. Estos siempre eran fáciles de distinguir por su aspecto alargado ondulado y casi siempre sin núcleo detectable. Esta observación fue utilizada como control interno positivo.

En ninguno de los 19 casos estudiados se pudo demostrar inmunoreactividad para el antígeno CD1 (T6).

II.2.2.- POBLACIONES LINFOCITARIAS.

El número de casos estudiados para cada tipo celular y la distribución de sus intensidades se resumen en la tabla 24.

TABLA 23.- RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CÉLULAS INTERDIGITANTES (S-100 +) Y LA DURACIÓN MEDIA DE LOS SÍNTOMAS CRANEALES.

S-100	TOTAL CASOS	TIEMPO DE EVOLUCIÓN (X̄ EN MESES)
POSITIVA	9	1,5
NEGATIVA	13	3,8
TOTAL	22	

p < 0,05

TABLA 24.- SUPTIPOS CELULARES EN LA AH

SUBTIPO CELULAR	Nº TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	INTENSIDAD				
		0	1+	2+	3+	4+
B	18	15	2	1	0	0
T	22	0	4	9	6	3
CD4	22	0	4	9	6	3
CD8	23	0	16	6	1	0
CÉLULAS-K	19	19	0	0	0	0
HISTIOCITOS	22	0	3	6	9	4
HLA-DR	19	0	2	9	5	3

II.2.2.1.- LINFOCITOS B.

La presencia de linfocitos B se estudió en 18 casos. Únicamente en 3 se detectaron células CD19 (Pan B) y/o CD22 (Pan B) positivas. En 2 casos, estas células eran muy ocasionales, aisladas y situadas en la zona de la capa media en un caso y en la adventicia en el otro (figura 15). En el tercer caso existió un grupo amplio de células CD19 y CD22 positivas en la adventicia y tejidos periarteriales muy bien delimitado y que parecía independiente del proceso inflamatorio que afectaba al resto de la pared arterial. Este grupo celular era también positivo para el HLA-DR. Los dos primeros casos eran AH clásicas y el tercero era una AH atípica. No existían datos clínicos, histológicos o inmunohistoquímicos diferenciales entre estos 3 casos y

II.2.2.2.- LINFOCITOS T.

La celularidad T fue estudiada en 22 casos y estuvo presente en todos ellos con mayor o menor intensidad (tabla 24) (figura 16). Así, se observaron células T ocasionales en 4 casos, focales en 9, intensas en 6 y muy intensas en 3. Los 4 casos con ocasionales células T eran todos ellos AH atípicas con escasa celularidad global en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Todos los casos con presencia muy intensa de células T se trataban de AH clásicas.

Las subpoblaciones T colaboradora (CD4 positiva) y T supresora/citotóxica (CD8 positiva) se estudiaron en 22 y 23 casos respectivamente. La tinción con el CD4 daba una ligera reactividad con los macrófagos, débil y granular, que podía distinguirse de la positividad más intensa y precisa de los linfocitos. Sin embargo, esta reactividad histiocitaria dificultaba el conteo celular por lo que únicamente se establecieron relaciones semicuantitativas entre células CD4 y CD8 positivas.

Las células CD4 inmunoreactivas fueron ocasionales en 4 casos, focales en 9, intensas en 6 y muy intensas en 3 (tabla 24). Los 4 casos con celularidad CD4 ocasional correspondían a una AH atípica. El número de células CD8 positivas fueron ocasionales en 16 casos, focales en 6, e intensas en 1 caso (tabla 24).

Ninguna arteria mostró una gran intensidad de células CD8. En los casos en los que se estudiaron ambas subpoblaciones CD4 y CD8, se evaluó semicuantitativamente la relación entre estos subtipos celulares en 3 grados en función de si la población CD4 predominaba intensamente sobre la población CD8 (++), si la predominancia era ligera (+) o si ambas poblaciones eran similares (-). De esta manera se detectaron 13 casos donde la relación CD4/CD8 era muy elevada (figuras 17 y

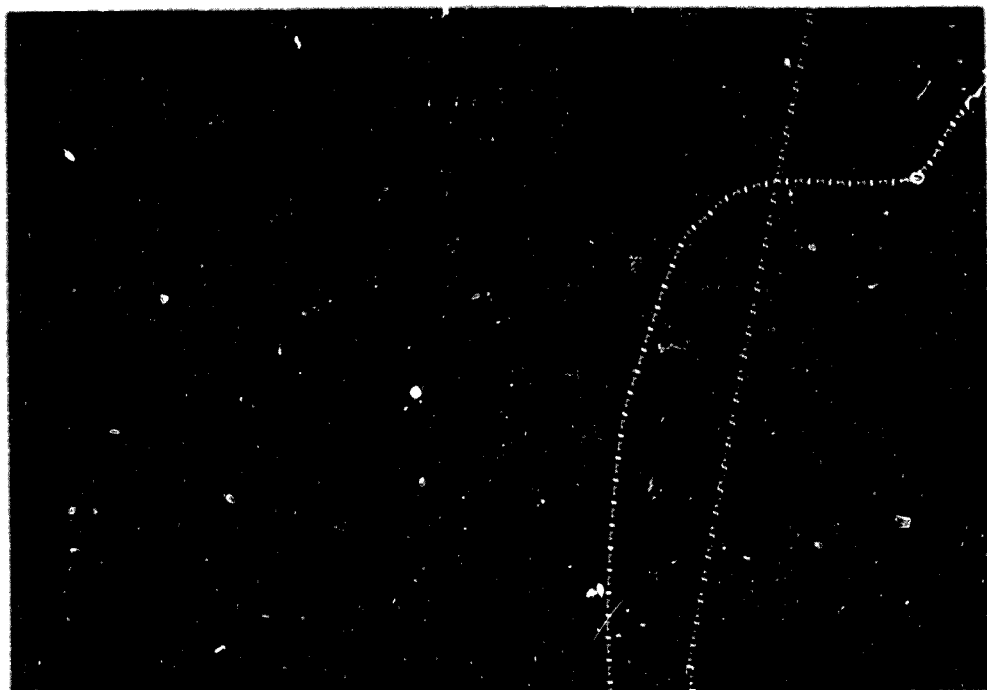


Figura 15.- Escasa positividad para linfocitos B (CD19). (FAAFA-hematoxilina x 250).



Figura 16.- El mismo segmento arterial muestra abundancia de linfocitos T (CD3). (FAAFA-hematoxilina x 250).

1ª), 5 donde las células CD4 predominaban ligeramente sobre las CD8 (figuras 19 y 20) y 4 casos donde la relación era similar.

En base a estos datos se estudió la relación entre el cociente CD4/CD8 y el tipo histológico de las arterias, el tiempo de evolución de los síntomas craneales y la duración del tratamiento. De los 17 casos de arteritis temporal clásica, 10 tenían una gran predominancia de CD4, 4 tenían predominio moderado y en 3 casos las poblaciones CD4 y CD8 eran parecidas. De forma similar en los 5 casos de arteritis temporal atípica la relación CD4/CD8 era elevada en 3 casos, moderada en uno y similar en otro. Así pues, no existía relación entre las subpoblaciones T y el tipo histológico de la enfermedad. Tampoco se observó relación entre la proporción de células CD4/CD8 positivas y el tiempo de evolución de los síntomas craneales. Aunque todos los pacientes con proporción CD4/CD8 similar habían sido tratados, no pudimos demostrar una relación significativa entre la proporción CD4/CD8 y la administración de corticosteroides (tabla 25).

II.2.2.3.- CELULAS K.

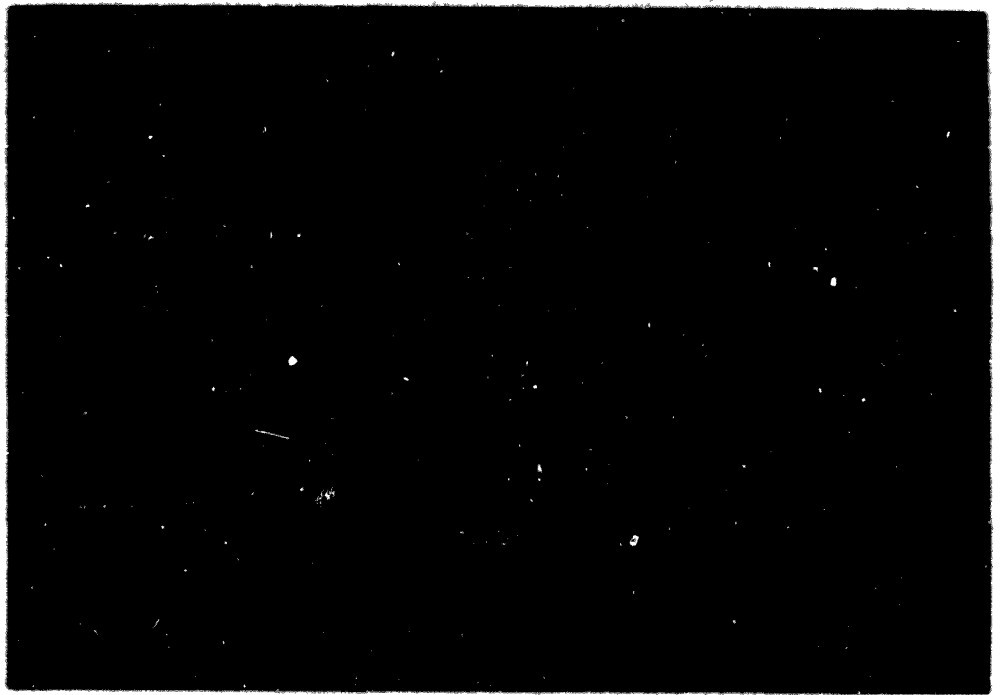
La presencia de células Leu 7 positivas (células K) fue estudiada en 19 casos (tabla 24). Todos ellos



Figuras 17 y 18.- Secciones seriadas de la misma arteria donde los linfocitos CD4 (figura 17) predominan claramente sobre los linfocitos CD8 (figura 18) (PAPANICOLAOU-hematoxilina $\times 200$).

TABLA 25.- RELACIÓN CD4/CD8 Y TRATAMIENTO

TRATAMIENTO	CD4/CD8++	CD4/CD8+	CD4/CD8=
≤ 4 DÍAS	9	4	2
> 4 DÍAS	4	1	2
TOTAL	13	5	4



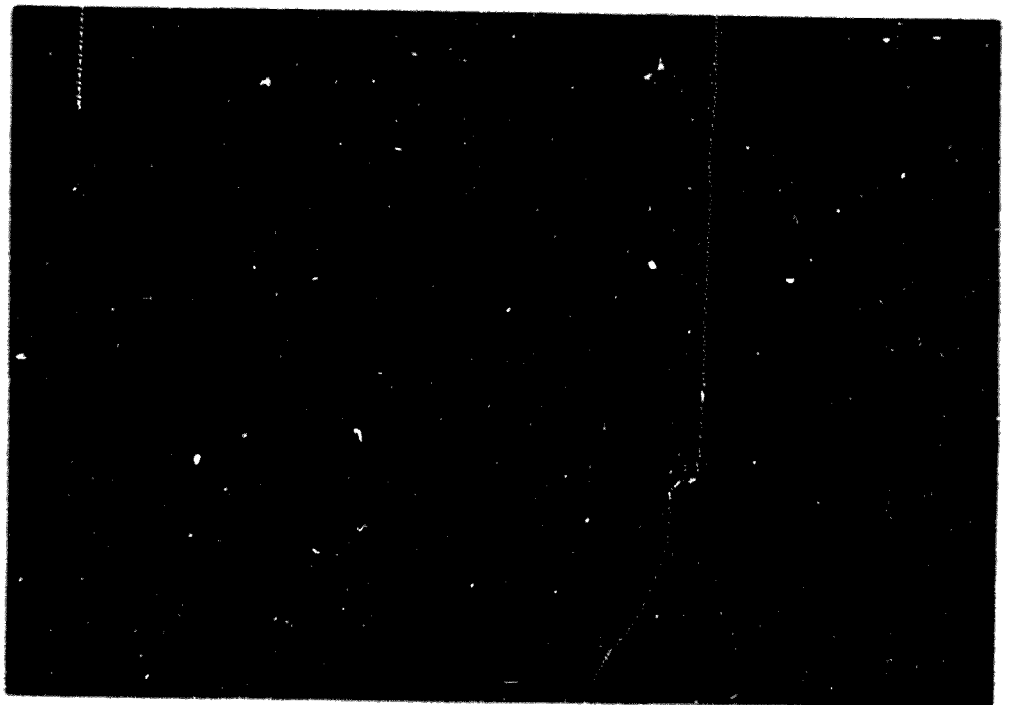
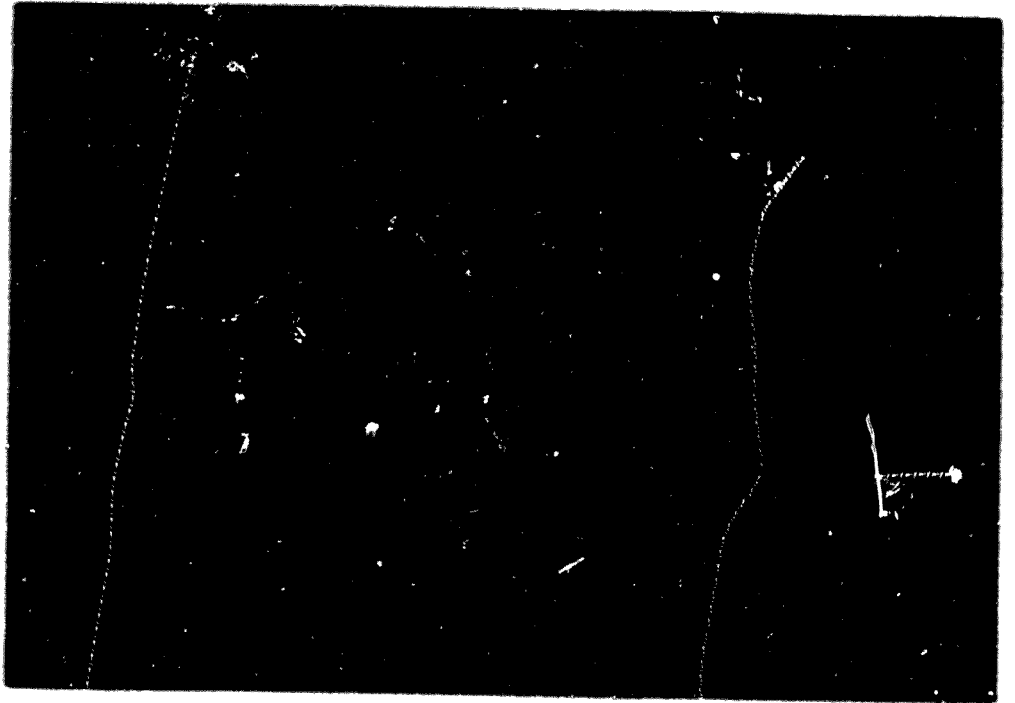
Figuras 19 y 20.- Secciones seriadas de una arteria donde los linfocitos CD4 (figura 19) son moderadamente más numerosos que los linfocitos CD8 (figura 20). (PAAFA-hematoxilina x 250).

resultaron negativos. En la mayoría de las secciones histológicas existía un control interno positivo que eran los filetes nerviosos ya que Leu 7 reconoce también una proteína relacionada con la mielina. En todos los casos los filetes nerviosos resultaron positivos.

II.2.3.- MACROFAGOS.

La población histiocitaria fue estudiada con el anticuerpo monoclonal EBM-11 en 22 casos y con la lisozima en 18 (figuras 21 y 23). La reactividad con ambos marcadores era parecida en la mayoría de los casos o ligeramente superior con el EBM-11. En 3 casos la positividad para la lisozima fue algo superior que para el EBM-11. Sin embargo, no es posible establecer comparaciones entre estos marcadores porque los cortes histológicos donde fueron estudiados correspondían a áreas diferentes de las arterias ya que la lisozima fue estudiada en el material fijado e incluido en parafina y el EBM-11 en las secciones congeladas. Los resultados, expresados en la tabla 24, reflejan la población identificada con ambos marcadores. El número de macrófagos detectado con los anticuerpos fue muy superior a lo que sugería el examen histológico convencional.

La distribución de los macrófagos era dispersa en la pared arterial con una cierta tendencia a disponerse



Figuras 21 y 22.- Secciones seriadas de la misma arteria que demuestran una abundante presencia de macrófagos (EBM-11) (figura 21) que predominan sobre los linfocitos T (CD3) (figura 22). (FAAFA-hematoxilina x 250).



Figura 23.- Macrófagos identificados mediante el suero anti-lisozima. (ABC-hematoxilina x 250).

en la zona de la lámina elástica interna. En algunos casos se observaron células positivas de forma alargada íntimamente asociadas a los restos de la lámina elástica, incluso siguiendo en parte la típica ondulación de estas fibras. Esta imagen fue preferentemente reconocida con el EBM-11. Las células gigantes multinucleadas fueron teñidas tanto con el EBM-11 como con la lisozima (figuras 24 y 25).

El número de macrófagos fue más elevado en las AH clásicas que en las atípicas (tabla 26). Cuando se compararon las poblaciones de linfocitos T y macrófagos se observó que en 10 de los 22 casos (46%) predominaban los macrófagos (figuras 21 y 22), en 9 casos (40%) existía una población similar de ambos tipos celulares, y en los otros 3 (14%) las células más abundantes eran los linfocitos T. Esta distribución no estaba influenciada por el tiempo de duración de los síntomas craneales ni por el tratamiento.

II.3.- ANTIGENOS DE ACTIVACION CELULAR.

II.3.1.- RECEPTOR DE LA INTERLEUKINA-2.

El receptor de la interleukina-2 (IL-2R) fue detectado en 15 de los 23 casos estudiados (65%). Las células positivas en todos ellos fueron ocasionales o

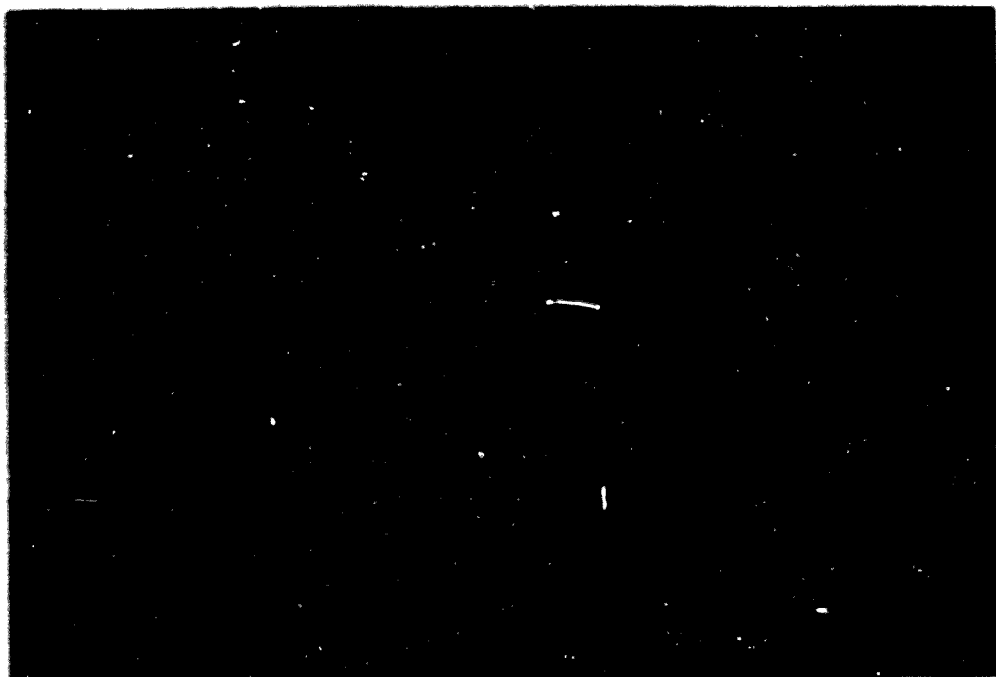


Figura 24.- Célula gigante multinucleada identificada mediante el Ac Mo EBM-11 de acuerdo con su estirpe macrofágica (FAAFA-hematoxilina x 400).



Figura 25.- Células gigantes multinucleadas teñidas con el suero anti-lisozima. (ABC-hematoxilina x 250).

TABLA 26.- RELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LA POBLACION HITIOCÍTICA Y EL SUBTIPO HISTOLÓGICO DE AH.

TIPO HISTOLÓGICO	TOTAL CASOS	INTENSIDAD	
		1-2+	3-4+
AH CLÁSICA	16	4	12
AH ATÍPICA	6	5	1
TOTAL	22	9	13

focales y no adoptaban ningún patrón de distribución particular (figura 26). No se observó relación entre la presencia de células IL-2R positivas y el tiempo de evolución de la sintomatología craneal o el tipo histológico. Por el contrario, la influencia del tratamiento con corticosteroides sobre la expresión del IL-2R fue muy marcada: 14 (87'5%) de los 16 casos en que la biopsia fue obtenida antes del inicio del tratamiento, o durante los primeros 4 días tras el inicio del mismo, resultaron positivos para el IL-2R frente a únicamente 1 (14%) de los 7 que habían recibido tratamiento durante más de 4 días ($p < 0'01$) (tabla 27).

II.3.2. ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE II.

La positividad para el HLA-DR se estudió en 19 casos. La intensidad de la inmunorreacción fue ocasional (+) en 2 casos, moderada (2+) en 9, intensa (3+) en 5 y muy intensa (4+) en 3 (figura 27) (tabla 24). El patrón de la positividad seguía una distribución muy similar a la observada con el EBM-11 sugiriendo que eran los macrófagos los principales responsables de la inmunorreactividad para DR (figuras 27 y 28). Asimismo las células teñidas para este antígeno tenían una morfología sugestiva de macrófago con amplios citoplasmas y bordes irregulares. En algunos casos las células DR

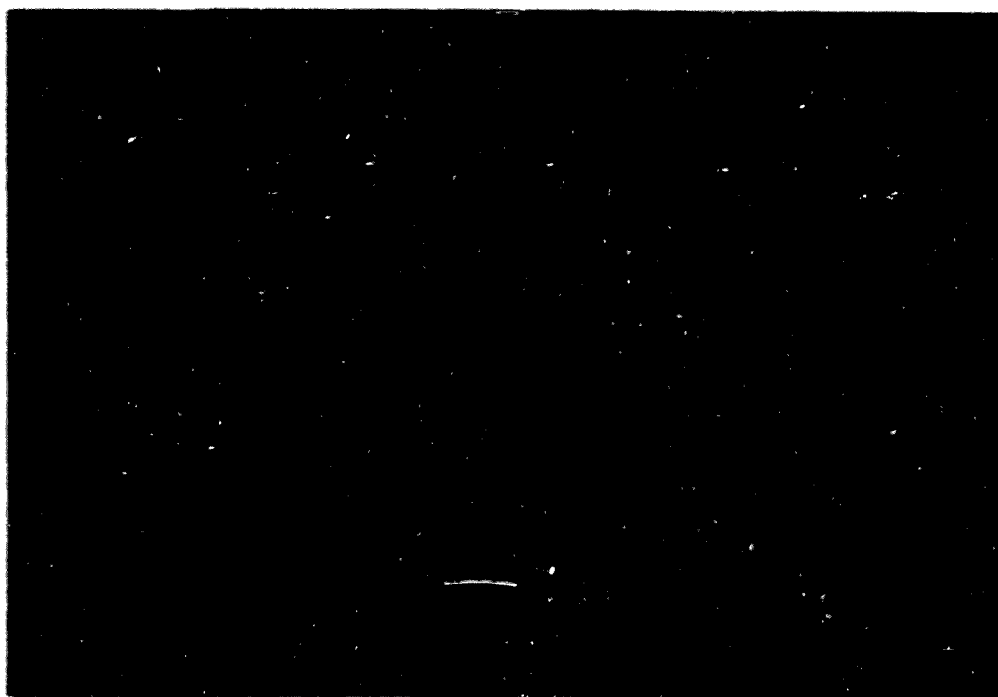
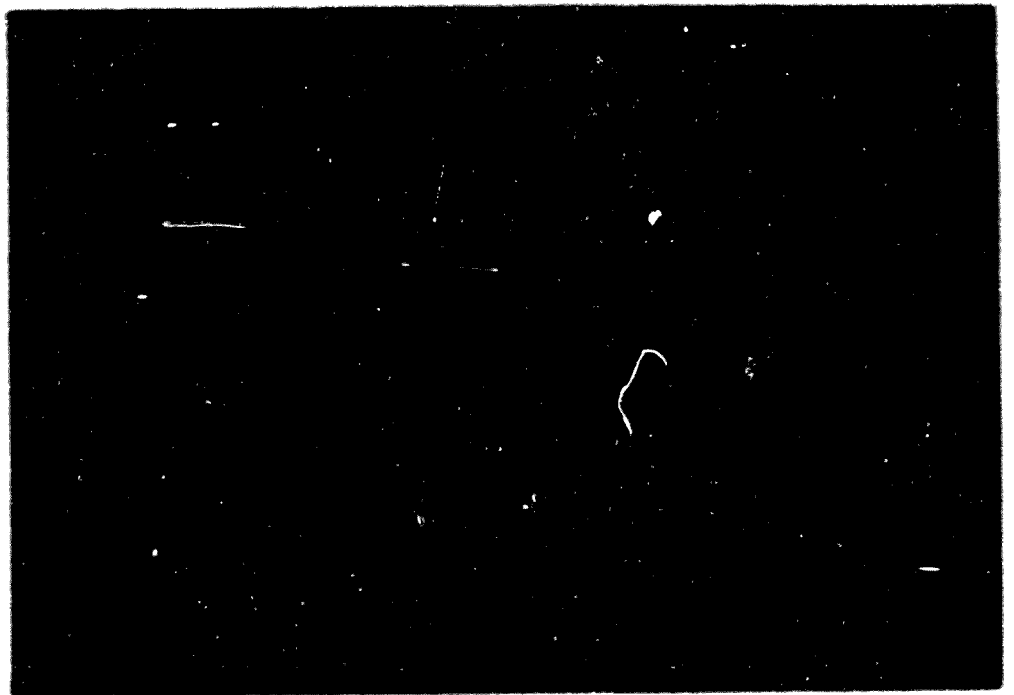


Figura 26.- Sección arterial procedente de un paciente no tratado que muestra inmunorreactividad para el IL-2R en algunas células aisladas (FAAFA-hematoxilina x 250).



Figuras 27 y 28.- Secciones seriadas del mismo caso que demuestran positividad para el HLA-DR (figura 27) siguiendo una distribución parecida al Ac Mo EBM-11 (figura 28). (FAAFA-hematoxilina x 250).

TABLA 27.- RELACIÓN ENTRE TRATAMIENTO Y EXPRESIÓN

DEL IL-2 R

DURACIÓN TRATAMIENTO	TOTAL CASOS	IL-2 R +	IL-2R -
≤ 4 DÍAS	16	14	2
> 4 DÍAS	7	1	6
TOTAL	23	15	8

p < 0,01

positivas se adosaban a las fibras elásticas al igual que ocurría con el EBM-11. Sin embargo, al comparar estrechamente las secciones teñidas para el EBM-11 y para el HLA-DR, en la mayoría de los casos, la intensidad de la reacción era superior con el primero que con el segundo. En 5 casos la positividad para DR fue francamente inferior que para el EBM-11 con un punto menos en el sistema de gradación utilizado en este estudio. De esta forma mientras sólo 4 (25%) de las AH clásicas tenían una intensidad de macrófagos de 1-2+, 7 (47%) de las mismas tenía una intensidad de 1-2+ para el HLA-DR. Ninguno de los 4 casos de AH atípica tuvieron una intensidad DR de 3+-4+. No se encontró ninguna relación entre la intensidad de la inmunorreactividad para DR y la duración de la clínica craneal de los pacientes ni con el tratamiento.

En la mayoría de las arterias, el endotelio expresaba también el antígeno DR.

D I S C U S I O N

I.- MANIFESTACIONES CLINICAS.

Las manifestaciones clínicas de los 65 pacientes fueron recogidas con detalle personalmente y de manera prospectiva en la mayor parte de pacientes con el fin de establecer correlaciones con el estudio inmunogénico. Por este motivo existen algunos aspectos que resulta interesante comentar.

Es de señalar el elevado porcentaje (98'5%) de pacientes que presentaron manifestaciones craneales. Sólo una paciente, cuya anamnesis fue dificultosa por la existencia de una demencia senil previa a la aparición de la enfermedad, negaba haber sufrido algún tipo de manifestación craneal y a la vez sus arterias temporales eran normales a la exploración física. Este hecho se debe probablemente al carácter parcialmente prospectivo del estudio donde se interrogó de manera dirigida no sólo sobre la presencia de manifestaciones clásicas de la enfermedad (cefalea, claudicación mandibular, alteraciones oculares), sino también sobre otras anomalías menos frecuentes tanto en el momento de la evaluación como en los meses previos. La relativa frecuencia en nuestra serie de manifestaciones consideradas raras como otalgia, odontalgia, dolor lingual, carotidinia y edema facial, obedece asimismo al

carácter semipropectivo del estudio. El frecuente hallazgo de anomalías a la exploración física de las arterias craneales (90%) es debido a la valoración no sólo del engrosamiento, signos inflamatorios o ausencia de pulso sino también de asimetrías e irregularidades en el mismo durante su trayecto y a la exploración del resto de arterias craneales.

Frente a la elevada proporción de pacientes que presentaron algún tipo de anomalía craneal contrasta en apariencia el notable porcentaje de pacientes (32%) que consultó por otros motivos (PMR aparentemente aislada, fiebre, anemia, pérdida de peso u otras alteraciones). En ellos los datos de anamnesis o exploración orientativos quedaban en segundo término. Sin embargo, al igual que en muchos de los casos descritos como formas de presentación atípica (94, 234, 283) estos datos se hallaban también presentes. Estos hallazgos corroboran la importante correlación existente entre la presencia de manifestaciones craneales, aunque leves y la positividad de la biopsia temporal tal como señalamos en estudios previos (117, 119, 439, 595), así como la necesidad de realizar una correcta anamnesis y exploración antes de prescribir una biopsia temporal a un paciente con sólo manifestaciones generales (117, 119).

A pesar de que la prevalencia de alteraciones visuales irreversibles parece haber disminuido en las series más recientes (48, 49, 95, 282, 320, 597) respecto a las series más antiguas (19, 245, 265, 298, 412, 618), todavía un 17% de nuestros pacientes sufrió defectos visuales permanentes. En todos ellos, existían en el momento de aparecer las complicaciones oculares, manifestaciones craneales características de la enfermedad suficientes para sospechar fuertemente el diagnóstico. Todos ellos habían consultado a un facultativo antes de desarrollar el defecto visual y excepto en un caso donde la amaurosis sobrevino a pesar de un tratamiento correcto (76) el resto no fueron diagnosticados ni, por supuesto, tratados antes de aparecer la complicación. Estos hechos traducen un conocimiento insuficiente de la enfermedad y una escasa sensibilización hacia su detección en nuestro medio.

Como se ha sugerido en algunas series recientes (48, 597), la presencia de fiebre fue significativamente menos frecuente en los pacientes con alteraciones oculares. La pérdida de peso fue también menos habitual entre los pacientes con déficits visuales permanentes. Estos datos, de confirmarse en series más amplias, podrían poseer un importante significado pronóstico al definir poblaciones de mayor riesgo de ce-

guera y poblaciones de menor riesgo. Esta división permitiría un ajuste terapéutico mejor para reducir las complicaciones yatrogénicas no despreciables en este grupo de pacientes (48).

Las características de edad y sexo de nuestros enfermos, así como el resto de manifestaciones clínicas son similares a las descritas en las series más numerosas (48, 49, 95, 245, 265, 267, 282, 298, 320, 321).