

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Síndrome antifosfolípido: diagnóstico clínico y analítico

 12 min.

En el siguiente trabajo el Dr. Cárdenas Delgado de la sección de Virología y Autoinmunidad de Laboratorios MANLAB nos presenta un trabajo sobre el Síndrome Antifosfolípido (SA). Clínicamente se ha comprobado la existencia de una estrecha relación entre los altos títulos de anticuerpos antifosfolípido y un incremento significativo en el nivel de riesgo a padecer eventos trombóticos. A continuación repasaremos brevemente los criterios diagnósticos y recomendaciones terapéuticas aceptados para el SA así como las nociones de las bases moleculares de esta afección.



Víctor M Cárdenas Delgado
Dr. en Bioquímica
Sección Virología y Autoinmunidad
Laboratorio MANLAB



E-mail: victor.cardenas@manlab.com.ar



Introducción

El síndrome antifosfolípido (SA) es una enfermedad autoinmune adquirida no inflamatoria en la que hallazgos serológicos correlacionan con un fenotipo pro-trombótico. Desde el punto de vista analítico, es

común en pacientes que padecen esta condición la presencia persistente de altos títulos de una familia de autoanticuerpos con amplia especificidad por fosfolípidos aniónicos o bien por proteínas que se unen a fosfolípidos [1]. Asimismo, se detectaron en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) autoanticuerpos anti-fosfolípido circulantes causantes de falsos positivos biológicos en el test diagnóstico para sífilis, pese a no haber evidencia clínica de enfermedad infecciosa [2]. Estudios prospectivos demostraron la asociación de estos anticuerpos anti-cardiolipina con las complicaciones trombóticas y obstétricas [3] descritas para el SA. Desde el punto de vista clínico, el SA se caracteriza por una predisposición a la trombosis, la cual puede tener lugar en lechos vasculares tanto arteriales como venosos.

El propósito de este trabajo es repasar brevemente los criterios diagnósticos y recomendaciones terapéuticas aceptados para el SA así como las nociones de las bases moleculares de esta afección.

Síndrome antifosfolípido

Clínicamente se ha comprobado la existencia de una clara asociación entre altos títulos de anticuerpos antifosfolípido y un incremento significativo en el nivel de riesgo a padecer eventos trombóticos tales como accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio, trombosis venosa profunda y tromboembolismo pulmonar [4, 5, 6]. Otra serie de manifestaciones clínicas de importancia comprendidas en el SA son las complicaciones obstétricas, presuntamente

derivadas de un deterioro en la perfusión placentaria: la pérdida de un feto morfológicamente normal a la décima semana de gestación o después, prematuridad de neonatos morfológicamente normales antes de la semana 34 de gestación o tres o más abortos espontáneos consecutivos antes de la décima semana de gestación [7]. En los casos en que concurren factores de riesgo tales como la hipercolesterolemia, la toma de anticonceptivos orales o estasis venosa con la detección de anticuerpos antifosfolípido, se recomienda tomar medidas preventivas para minimizar el riesgo de eventos trombóticos asociados a estas variables [8].

El estado de hipercoagulabilidad que impone el SA suele afectar en un 29-50 % a las extremidades inferiores de los pacientes [1], con o sin tromboembolismo pulmonar. Las manifestaciones derivadas de la oclusión arterial son más raras, estando los eventos de isquemia cerebral o cardíaca entre los más frecuentes dentro de este subgrupo. Hallazgos histopatológicos y clínicos confirmaron que hay riesgo de desarrollar una microangiopatía trombótica que, según la severidad y extensión de la oclusión puede llevar al compromiso de otros órganos [9]. En el caso que la disfunción se extienda a tres o más tejidos en el curso de una semana se trataría de una variante de presentación clínica agresiva conocida como SA catastrófico [10], si bien no están establecidas aún las variables que lo precipitan.

Existe otra serie de manifestaciones clínicas asociadas a la presencia de

anticuerpos anti-fosfolípido que no son consideradas patognomónicas de SA pero se encontraron frecuentemente en la práctica clínica tales como trombocitopenia, migraña, anomalías valvulares cardíacas, livedo reticularis y disfunción cognitiva no relacionada a la trombosis [1].

La terapéutica con anticoagulantes orales se ha instaurado como una herramienta que apunta a prevenir la recurrencia de eventos trombóticos en pacientes con SA. No obstante, a juzgar por los resultados de ensayos clínicos prospectivos y retrospectivos existe controversia en relación al objetivo del tratamiento con este grupo de fármacos. De esta manera, no hay consenso entre los paneles de expertos con respecto a la duración del tratamiento con warfarina ni al valor de Razón Internacional Normalizada (RIN) a alcanzar en esquemas a largo plazo. En este contexto, existen recomendaciones de optar por una terapia anticoagulante de intensidad moderada estableciendo como objetivo un

RIN de 2.0-3.0 [11].

Por otro lado, en pacientes asintomáticos con serología positiva se ha implementado el uso de antiagregantes como medida profiláctica. En particular, la aspirina parece ser efectiva en pacientes mujeres con historial de abortos espontáneos y altos títulos de anticuerpos anti-cardiolipina, pero no en hombres con el mismo perfil serológico [12]. En pacientes que cursan con SA catastrófico se implementaron con éxito intervenciones más radicales como la inmunoblación con esteroides, rituximab o ciclofosfamida [13]. En todo caso, existen opiniones en favor de adaptar individualmente los esquemas terapéuticos recomendados.

Mecanismos patogénicos

Diversos mecanismos que apuntan a explicar la fisiopatología del SA han sido postulados, algunos de los cuales hacen énfasis en la manera en que los

anticuerpos anti-fosfolípido contribuyen al desarrollo de las manifestaciones clínicas. Así, evidencias tanto de ensayos *in vivo* e *in vitro* sugieren la existencia de vías alternativas que inclinan el balance hemostático en favor de un fenotipo pro-trombótico, siendo una de las más relevantes aquella en la que autoanticuerpos interactúan con un dominio específico de 2-glicoproteína I (2GPI). En la actualidad es aceptado el concepto de que si bien la familia de anticuerpos antifosfolípido es heterogénea en cuanto a la especificidad, los antígenos dominantes serían 2GPI y la protrombina, una proteína de síntesis hepática vitamina-K dependiente [14].

2GPI es una glicoproteína circulante en plasma de función desconocida con un PM de 44 kDa que consta de 5 pequeños dominios denominados con los números romanos del I al V. Una de las hipótesis más aceptadas propone que 2GPI existe en dos conformaciones (Figura 1): una forma predominante en plasma aproximadamente

BD Vacutainer® Líder en Soluciones Preanalíticas

La familia de productos **BD Microtainer®** ofrece soluciones para la toma de muestra capilar.

Para contactarse, llámenos al:
0800-444-55BD (23) o escribanos
a: vacutainer@bd.com



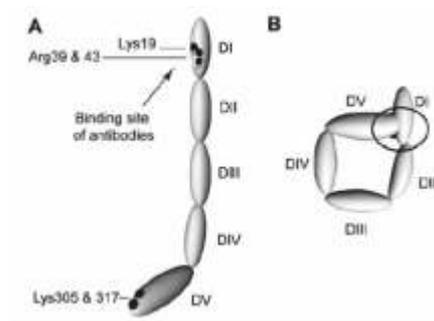
circular y una forma abierta símil-anzuelo [15]. La conformación circular (cerrada) de 2GPI sería mantenida por una interacción intramolecular débil entre residuos de los dominios I y V, en la que aparentemente una estructura glucídica sería la responsable de estabilizar la estructura tridimensional [16]. Por otro lado, la interacción con superficies cargadas negativamente como fosfolípidos aniónicos sería el factor responsable de desplazar el equilibrio en favor del conformero símil-anzuelo (abierto). Se piensa que de esa forma se expone un epítipo críptico discontinuo que reside en el dominio I de 2GPI, parcialmente formado por los residuos Gly40-Arg43 en la estructura primaria y tornándolo francamente inmunogénico [17]. De esta manera los autoanticuerpos de especificidad por el dominio I (pero no por el resto de los dominios) de 2GPI se unen y desencadenan eventos metabólicos que conducen al estado de hipercoagulabilidad del SA, si bien no es claro aún el mecanismo íntimo de estos cambios ni la etiología de los autoanticuerpos. Por otro lado, es de destacar la presencia de anticuerpos anti-2GPI con especificidad por otros dominios de la molécula en pacientes que no tienen manifestaciones clínicas de SA, lo que compromete su valor como herramienta diagnóstica [18].

Se comentó brevemente que pacientes con enfermedades autoinmunes como LES presentan un fenómeno en el que un factor plasmático prolonga el tiempo de coagulación en ensayos funcionales dependientes de fosfolípidos *in vitro*. Ese factor se denominó Inhibidor Lúpico o Anticoagulante Lúpico (IL-AL), pese a que su detección se asocia más bien a eventos trombóticos *in vivo*. Pese a que no se ha caracterizado completamente la identidad química del IL, está demostrado que la actividad anticoagulante está causada por una familia de autoanticuerpos de especificidad heterogénea, principalmente inmunoglobulinas anti-2GPI y/o anti-protrombina [19].



Figura 1. Representación esquemática de las

formas circular y abierta de 2GPI. (A) 2GPI con sus 5 dominios (DI-DV) tal como se presenta en el complejo con anticuerpos anti-2GPI. (B) Un modelo propuesto para 2GPI plasmático. Los puntos negros representan los aminoácidos no accesibles a la tripsina, la flecha negra indica los aminoácidos implicados en el reconocimiento de los anticuerpos anti-2GPI. En la conformación circular, el círculo negro indica la concurrencia de los aminoácidos implicados en el sitio de unión a los anticuerpos anti-2GPI como resultado de la interacción de los dominios I y V de 2GPI.



Diagnóstico de SA

Los esfuerzos para definir los criterios diagnósticos del SA condujeron al enunciado de una clasificación preliminar en el año 1998 (conocidos como criterios Sapporo) [20], que fue luego sujeta a revisión y actualizada [7] por un comité de expertos en el año 2006.

El diagnóstico de SA depende de la presencia de al menos uno de los criterios clínicos y uno de los criterios de laboratorio entre los enumerados por el comité. El criterio de laboratorio exige reactividad para el anticoagulante lúpico (AL) detectado por una prueba de coagulación *in vitro*, anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) de isotipo IgG y/o IgM y anticuerpos anti-2GPI (a 2GPI) de isotipo IgG y/o IgM, ambos detectados por la técnica de ELISA. El umbral para la positividad de los aCL se definió en valores > 40 MPL o GPL (1 MPL o GPL es equivalente a 1 mg/ml de IgM o IgG purificados por cromatografía de afinidad, respectivamente) mientras que para a 2GPI la positividad se define como mayor al percentilo 90 de la distribución normal, y es

requisito que el resultado positivo se presente en dos o más ocasiones por lo menos con un intervalo de 12 semanas a fin de descartar aumentos transientes en los títulos de autoanticuerpos relacionados con infecciones o administración de ciertos fármacos [7].

La determinación del anticoagulante lúpico (AL) es un ensayo funcional en el que autoanticuerpos de diversa reactividad prolongan el tiempo de coagulación o el tiempo de protrombina *in vitro*, y se demostró que posee mejor correlación con la trombosis que los inmunoensayos que detectan aCL y anti-2GPI [21]. En general, los resultados de los ensayos serológicos presentan problemas relacionados con su excesiva sensibilidad o poca especificidad como para considerarse concluyentes. Son conocidos los inconvenientes para estandarizar las técnicas de ELISA mencionadas, los cuales sumados a la falta de un patrón internacional generan gran variabilidad entre los resultados obtenidos con kits de distintos fabricantes. De esta manera, factores como la fuente del antígeno utilizado para preparar las placas de ELISA o bien el material que las constituye afectan directamente la performance de los kits para la detección de anticuerpos aCL y a 2GPI que se comercializan en la actualidad [22]. No obstante, la combinación de los resultados de los ensayos serológicos y el AL brindan el poder de discriminar entre aquellos pacientes con alto riesgo de trombosis y estratificarlos en base al mismo. Por ejemplo, los pacientes triple-positivos que no presentan manifestaciones clínicas de SA se estimó un riesgo anual de 5,3% [23] de padecer eventos trombóticos.

La sección Virología y Autoinmunidad de MANLAB asiste en el diagnóstico del SA a través de la determinación automatizada por la técnica de ELISA de:

- 1-Anticuerpos anti-cardiolipinas totales,
- 2-Anticuerpos anti-cardiolipina de isotipo IgM/IgG,
- 3-Anticuerpos anti-b2GPI de isotipo IgM/IgG
- 4-Anticuerpos anti-fosfolípido de isotipo IgM/IgG,

5-Anticuerpos anti-fosfatidilserina de isotipo IgM/IgG.

Además, la sección de Hematología y Hemostasia de MANLAB está a cargo de la determinación del Inhibidor Lúpico. Los detalles de las prestaciones mencionadas se encuentran disponibles para su consulta en página web del laboratorio MANLAB (<http://www.manlab.com.ar>).



Referencias

- [1] Levine JS, Ware Branch D, Rauch J (2002) "The Antiphospholipid Syndrome" N Engl J Med. 346:752-763.
- [2] Haserick JR, Long R (1952) "Systemic lupus erythematosus preceded by false-positive serologic tests for syphilis: presentation of five cases" Ann Intern Med. 37(3):559-565.
- [3] Giannakopoulos B, Krilis SA (2013) "The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome." N Engl J Med. 368(11):1033-1044.
- [4] Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ (1992) "Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis." Ann Intern Med. 117(12):997-1002.
- [5] Levine SR, Brey RL, Joseph CL, Havstad S (1992) "Risk of recurrent thromboembolic events in patients with focal cerebral ischemia and antiphospholipid antibodies. The Antiphospholipid Antibodies in

Stroke Study Group." Stroke. 23(2):29-32.

- [6] Vaarala O, Mänttari M, Manninen V, Tenkanen L, Puurunen M, Aho K, Palosuo T "Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men." Circulation. 91(1):23-7.
- [7] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA (2006) "International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)." J Thromb Haemost. 4(2):295-306.
- [8] Giron-Gonzalez JA, del Rio EG, Rodríguez C, Rodríguez-Martorell J, Serrano A (2004) "Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals." J Rheumatol. 31:1560-1567.
- [9] Hughson MD, McCarty GA, Brumback RA (1995) "Spectrum of vascular pathology affecting patients with the antiphospholipid syndrome." Hum Pathol. 26(7):716-724.
- [10] Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, et al. (2003) "Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines." Lupus. 12(7):530-534.
- [11] Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, Laskin C, Fortin P, Anderson D, Kearon C, Clarke A, Geerts W, Forgie M, Green D, Costantini L, Yacura W, Wilson S, Gent M, Kovacs MJ (2003) "A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome." N Engl J Med. 349: 1133-1138.
- [12] Erkan D, Merrill JT, Yazici Y, et al. (2001) "High thrombosis rate after fetal loss in antiphospholipid syndrome: effective prophylaxis with aspirin." Arthritis Rheum. 44:1466-1467.
- [13] Brodsky RA, Petri M, Smit BD, et al. (1998) "Immunoablative high-dose cyclophosphamide without stem cell rescue for refractory, severe autoimmune disease." Ann Intern Med. 129:1031-1035.
- [14] Forastiero R, Martinuzzo ME, Adamczuk Y, Carreras LO (1999) "Occurrence of anti-prothrombin antibodies and anti-beta2glycoprotein I antibodies in patients with a history of thrombosis." J Lab Clin Med. 134:610-615.
- [15] Agar C, van Os GM, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, Derksen RH, Meijers JC, de Groot PG (2010) "Beta2-

glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome." Blood. 116(8):1336-1343.

- [16] de Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG (2006) "Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change." Blood. 107(5):1916-1924.
- [17] See comment in PubMed Commons below de Laat B, Mertens K, de Groot PG (2008) "Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathogenic mechanism." Nat Clin Pract Rheumatol. 4(4):192-199.
- [18] Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T (2002) "Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature." Blood. 101(5):1827-1832.
- [19] Forastiero R, Martinuzzo ME, Marta E (2005) "Antigen Specificity and Clinical Relevance of Antiphospholipid Syndrome-Related Autoantibodies" Current Rheumatology Reviews 1(2):177-187(11).
- [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 (1999) "International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop." Arthritis Rheum. 42(7):1309-1311.
- [21] Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T (2003) "Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature." Blood. 101(5):1827-1832.
- [22] de Groot PG, Derksen RH, de Laat B (2008) "Twenty-two years of failure to set up undisputed assays to detect patients with the antiphospholipid syndrome." Semin Thromb Hemost. 34(4):347-355.

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Autoinmunidad

Porque la exactitud se consigue con reactivos de calidad e instrumentos fiables.

Amplia gama de productos conforman nuestras líneas de ELISA e IFI de Biosystems.

- ▶ Sistema de alta expresión antigénica.
- ▶ Inmejorable calidad y expresión de antígenos nucleares y citoplasmáticos.
- ▶ Sin ruido de fondo.
- ▶ Enfermedades autoinmunes sistémicas, Síndrome antifosfolípido, Enfermedad Celíaca.
- ▶ Conjugados estandarizados frente referencia OMS.

Microscopio de fluorescencia LED



- ▶ Sin necesidad de alineación de la fuente de luz.
- ▶ Sin necesidad de reemplazo de la fuente de luz.
- ▶ Sin tiempo de precalentamiento, instrumento listo para el uso en cualquier momento.
- ▶ Elevada relación señal / ruido.
- ▶ Permite la observación en campo claro.
- ▶ Eficiencia energética y de bajo consumo.
- ▶ LED no genera calentamiento.

alere.com

ALERE
14 de Julio 618, Buenos Aires Argentina
Tel: (011) 4554-4007 Fax: 4553-2141