

ANTICOAGULANTES LÚPICOS VERSUS ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

M^a ISABEL PEREIRA

Serviço de Patologia Clínica. Hospital Distrital do Barreiro. Barreiro

RESUMO

Os anticorpos antifosfolípidos (aPL) presentes no síndrome antifosfolípido-proteína e nas doenças autoimunes, estão associados à ocorrência de episódios tromboembólicos, tais como, trombozes arteriais e/ou venosas e mortes fetais. Os doentes com anticorpos antifosfolípidos têm, por definição, anomalias laboratoriais, nos ensaios de coagulação e/ou nos imunoensaios de fase sólida, ELISA, ou radioimunoensaio (RIA). Pensou-se, inicialmente, que estes sistemas de ensaio detectavam anticorpos dirigidos contra fosfolípidos. O problema complicou-se quando foi divulgado que o fosfolípido não era o único antígeno, mas apenas uma parte, e a outra contribuição era devida à B2-glicoproteína I (b2-GP I). Constatações seguintes demonstram que os aPL são, de facto, anticorpos anti-b2-GP I, dirigidos contra um epitopo expresso, quando a b2-GP I se encontra ligada a fosfolípidos aniónicos ou a uma superfície apropriada. Trabalhos recentes demonstraram que anticorpos relacionados com o anticoagulante lúpico (LA) induzem uma actividade anticoagulante na b2-GP I. Alguns destes LA requerem a ligação a fosfolípidos. No entanto, nem todos os LA requerem a b2-GP I como cofactor. A protrombina humana é um antígeno para alguns LA IgG's. Finalmente é descrita uma subclassificação dos anticoagulantes que prolongam os testes de coagulação fosfolípido-dependentes, pois que parecem existir várias subclasses de LA, realçando os critérios clínicos e laboratoriais necessários, para estabelecer o diagnóstico do síndrome antifosfolípido-proteína.

SUMMARY

Lupus Anticoagulants versus Antiphospholipid Antibodies

The antiphospholipid antibodies (aPL) present in "antiphospholipid-protein syndrome and autoimmune disorders are associated with thromboembolic episodes, such as venous and/or arterial thrombosis and fetal loss. Patients with antiphospholipid antibodies have, by definition, laboratory abnormalities in either coagulation assays or various solid phase immunoassays ELISA or radioimmunoassays (RIA). These assay systems were initially thought to detect antibodies against phospholipids. The problem was complicated when it was reported that phospholipid is not the sole antigen but only a part of it, the other contribution being due to b2-glycoprotein I (b2-GP I). More findings, demonstrate that the aPL are in fact anti-b2-GP I antibodies directed against an epitope which is expressed when b2-GP I is bound to anionic phospholipid or another suitable surface. Recent studies have demonstrated that antibodies related to lupus anticoagulant (LA) induce an anticoagulant activity in b2-GP I. Some of these LA require binding to phospholipid. However, not all LA require b2-GP I as a cofactor. Human prothrombin is an antigen for some LA IgG's. Finally, a subclassification of phospholipid-dependent coagulation test anticoagulants is described, there appear to be several subclasses of LA, and the clinical and laboratory criteria required to establish the diagnosis of antiphospholipid-protein syndrome is emphasised.

INTRODUÇÃO

Perante um teste de fixação de complemento, para detecção de reaginas presentes no soro de doentes com sífilis, em que, inicialmente empregou extratos de fígado

de fetos com sífilis congénita, que posteriormente substituiu por extratos tissulares de músculo cardíaco bovino (cardiolipina)¹, Wassermann foi quem, pela primeira vez, detectou os anticorpos antifosfolípidos (aPL), já no

ano de 1906.

Decorridas algumas décadas, em 1952, Conley e Hartmann descreveram uma alteração da coagulação caracterizada por prolongamentos do aPTT e sem prolongamento do tempo de trombina. Verificaram ainda que o plasma dos doentes com estas alterações interfere com a coagulação dos plasmas normais, num teste de mistura de plasmas, atribuindo esta perturbação à presença de um inibidor (anticoagulante)².

Posto que o reconhecimento deste tipo de inibidor (anticoagulante) se reportasse à data referida, a designação amplamente divulgada de *anticoagulante lúpico* (LA), ainda hoje assim conhecido, só foi introduzida em 1971 por Feinstein e Rapaport. E isto, devido à constatação inicial de que a presença de tal inibidor era observada em doentes com Lupus Eritematoso Sistémico (LES)³.

Uma dezena de anos mais tarde, 1963, Bowie et al detectaram e descreveram a associação verificada entre a presença do *anticoagulante lúpico* (que se julga serem anticorpos antifosfolípidos) e a ocorrência de fenómenos trombóticos, num grande número de doentes⁴.

Confirmada esta observação, por diversos trabalhos subsequentes, é actualmente aceite, entre os cientistas, que a presença dos aPL se encontra associada a uma tendência aumentada para trombose arterial e/ou venosa.

Em 1975, Nilsson et al descreveram, pela primeira vez, a associação que existia entre a presença de aPL com mortes fetais intra-uterinas e abortos de repetição, que se crê originadas por trombose dos vasos placentários e deciduais⁵.

Perante a constatação dos referidos cientistas, confirmada por numerosos trabalhos subsequentes, aceita-se que uma mulher grávida, com aPL, têm uma tendência acrescida para abortos de repetição, no primeiro trimestre de gravidez e para mortes fetais intra-uterinas, nos segundo e terceiro trimestres.

Desde aí, os aPL passaram a ser descritos como estando associados a eventos trombóticos, mortes fetais e trombocitopénia, com ou sem evidência de doença autoimune.

Harris et al, em 1983, aprofundando o estudo dos aPL, desenvolveram um radioimunoensaio⁶ e mais tarde um *enzyme-linked immunoassay* (ELISA)⁷ com a finalidade de detectar, caracterizar e quantificar os anticorpos antifosfolípidos. Os mesmos, em 1987, após estudos aturados, introduzem a designação *Síndrome antifosfolípido* (APS), na qual agrupam os doentes com anticorpos antifosfolípidos, associados

a eventos trombóticos, mortes fetais e, embora menos frequentemente, também com trombocitopénia⁸.

ANTICORPOS ANTI-FOSFOLÍPIDOS

A expressão anticorpos anti-fosfolípidos (aPL), refere-se a um grande grupo de imunoglobulinas, até muito recentemente consideradas uma família diversa de imunoglobulinas heterogénias, estreitamente relacionadas entre si, mas ligeiramente diferentes, partilhando em comum a reactividade para com os fosfolípidos carregados negativamente e pertencentes às classes IgG, IgM, e IgA⁹.

Esta concepção, hoje largamente generalizada, para os aPL, é fundamentada no pressuposto de que os vários sistemas de ensaio, utilizados para o seu estudo, e que empregam fosfolípidos (PL) como antigénios alvo, detectam anticorpos dirigidos unicamente contra os fosfolípidos¹⁰. No entanto, o significado da detecção destes anticorpos por estes testes revelou-se algo complexo e não está completamente esclarecido. De facto, têm surgido, na literatura médica, novas propostas, umas mais plausíveis que outras, para a sua correcta interpretação.

Assim, constatou-se que os doentes com aPL podem ter um ou mais dos seguintes testes positivos: o imunoensaio de fase sólida para o anticorpo anti-cardiolipina (ACA), os testes do anticoagulante lúpico (LA) e menos frequentemente os Standart Tests for Syphilis (STS)¹¹.

Pensou-se inicialmente que os três subtipos de aPL (STS, LA e ACA), eram manifestações diferentes do mesmo anticorpo. Inclusivamente, é possível que alguns anticorpos possam exprimir todas as três actividades dos aPL. Se bem que seja aceite por muitos investigadores que estes testes detectam grupos relacionados de anticorpos, também é evidente que um teste pode ser positivo e outro negativo.

Devido à falta de concordância entre os resultados dos diferentes testes, a qual não pode ser explicada pelas diferenças de sensibilidade dos testes, a maior parte dos investigadores concorda, actualmente, que os aPL detectados por um teste não têm que ser necessariamente os mesmos que os detectados por outro¹². Inclusivamente, é possível que outros anticorpos com outras especificidades, que não sejam os fosfolípidos, possam também dar um resultado positivo nos testes do anticoagulante lúpico e nos imunoensaios de fase sólida.

Para explicar a falta de correlação existente entre os diversos testes, e a inter-relação observada entre as três actividades, postulou-se que a família heterogénea dos

aPL, poderia ser dividida em vários subgrupos com actividades diferentes, detectadas por determinados procedimentos laboratoriais, com maior especificidade para aquele subtipo de anticorpo. Mais, os doentes com aPL positivos poderiam ter um ou mais de um subgrupo de aPL¹³.

Por outro lado, existe um considerável interesse na relação entre a presença dos aPL e o desenvolvimento de processos trombóticos. Qualquer dos três subtipos de aPL (STS, LA e ACA) pode estar associado à trombose, independentemente da presença ou não dos outros. No entanto, muitos doentes com estes anticorpos não sofrem de trombose¹⁴.

A presença de várias classes de aPL explica, em certa medida, a grande variedade de expressões clínicas e laboratoriais observadas na presença de aPL¹³.

Portanto, até ao estado actual da ciência, os aPL podem ser detectados mediante a expressão laboratorial de actividades diferentes, isoladas ou em associação. Dessas diferentes actividades, destacamos três, clinicamente significantes, como de seguida se apresenta.

FALSOS POSITIVOS BIOLÓGICOS NOS TESTES SEROLÓGICOS PARA A SÍFILIS

Um dos subgrupos dos aPL, designados *biological false positive serological test for syphilis* (BFP-STS), exhibe uma falsa positividade biológica nos testes serológicos de screening para a sífilis, tais como o Venereal Diseases Research Laboratories (VDRL) e o Rapid Plasma Reagin (RPR) que empregam, como antigénio alvo, uma mistura de fosfolípidos, contendo colesterol, fosfatidilcolina e cardiolipina. É a cardiolipina carregada negativamente (assim chamada porque foi originalmente extraída de tecido cardíaco bovino), que reage com os anticorpos (reaginas) produzidos em resposta à infecção sífilítica e detectados também, por vezes, na ausência desta infecção¹¹. Estes últimos são os falsos positivos biológicos dos testes para a sífilis (BFP) e podem ser produzidos em resposta a uma infecção produzida por uma série de agentes patogénicos não treponémicos, ou em doentes com doenças autoimunes, particularmente doentes com Lupus Eritematoso Sistémico (LES) e/ou Síndrome Antifosfolípido (APS)^{15,16}.

No primeiro caso, os BFP têm um carácter transitório, reflectindo, muito provavelmente, uma actividade recente do agente patogénico. Estes anticorpos não estão associados com trombose e morte fetal. Mais, os aPL encontrados nas doenças infecciosas, incluindo a sífilis, podem ser detectados pelos STS, por meio de ensaios de

fase sólida tais como RIA ou ELISA, mas não pelos testes de coagulação dependentes dos fosfolípidos. Mais ainda, foi demonstrado que os aPL das doenças infecciosas se ligam directamente ao fosfolípido (cardiolipina) na ausência de b2 Glicoproteína I (b2-GP I).

No segundo caso, estes autoanticorpos podem persistir por muitos anos, estão muitas vezes associados com doenças tromboembólicas (tais como trombose e morte fetal) e podem determinar resultados positivos nos standard tests for *syphilis* anteriormente referidos, juntamente com um prolongamento dos testes de coagulação que empregam PL. Ainda, e ao contrário dos aPL das doenças infecciosas, a ligação dos aPL das doenças autoimunes aos fosfolípidos é mediada por um cofactor proteico plasmático - a b2-GP I - também conhecida por apolipoproteína H¹⁴.

Entende-se, portanto, que os doentes com sífilis, também têm anticorpos antifosfolípidos, detectados pelos standard tests for *syphilis* (STS). Mas estes anticorpos são, seguramente, diferentes dos encontrados nos doentes com Síndrome antifosfolípido (APS) e/ou doenças autoimunes¹².

ANTICOAGULANTES LÚPICOS

Outro subgrupo dos aPL, designados anticoagulantes lúpicos ou melhor anticoagulantes lupus-like, exibem uma *paradoxal* actividade anticoagulante *in vitro*, nos testes de coagulação dependentes dos fosfolípidos, pela interferência com o componente fosfolípido do complexo activador da protrombina, que consiste no factor Xa, factor Va, cálcio e fosfolípido¹⁷⁻¹⁹.

Os anticoagulantes lúpicos (LA), que até muito recentemente se acreditava constituírem uma família também heterogénea de anticorpos, com afinidades variáveis para um grande número de complexos fosfolípidicos, compreendem anticorpos das classes IgG, IgM e, menos frequentemente, IgA(20).

A grande heterogeneidade laboratorial apresentada por estes anticorpos, na sua detecção e na confirmação da sua natureza antifosfolípida, está na base da recomendação da realização de uma sequência combinada de testes para a sua investigação.

Assim, um grande número de ensaios de coagulação são, actualmente, usados para rastreio do LA. Estes incluem o *activated partial thromboplastin time* (APTT), *kaolin clotting time* (KCT), *dilute Russell viper venom test* (dRVVT) entre outros.

Não existe acordo, na literatura, em relação a qual deles, é o mais específico e o mais sensível. No entanto, é opinião generalizada que nenhum teste, por si só, con-

segue detectar todos os LA²¹. O diagnóstico do LA deve ser confirmado usando os critérios recentemente estabelecidos pelo SSC Subcommittee for Standardization of Lupus Anticoagulants^{10,37}.

ANTICORPOS ANTI-CARDIOLIPINA ANTI-FOSFATIDILSERINA

O terceiro subgrupo de aPL, pode ser detectado por imunoensaios de fase sólida (enzime-linked immunosorbent assay (ELISA) ou radioimmunoassay (RIA)), usando fosfolípidos aniônicos (principalmente cardiolipina e fosfatidilserina) ou fosfatidiletanolamina de fase hexagonal, adsorvidos sobre um suporte sólido¹³.

Os anticorpos anticardiolipina (ACA), detectados por imunoensaios de fase sólida, podem ser considerados como sendo um desenvolvimento do RPR e VDRL para a sífilis, os quais utilizam com o antigénio o fosfolípido cardiolipina. Este imunoensaio para a detecção de ACA provou ser 200 a 400 vezes mais sensível que o VDRL^{22,23}.

Outros antigénios fosfolipídicos, além da cardiolipina, têm sido utilizados em ensaios de fase sólida para a detecção de Ac anti-fosfolípidos (aPL), porque parece pouco provável que a cardiolipina seja o antigénio fisiológico para os ACA, pois que é encontrada quase exclusivamente na mitocôndria e não parece, por isso, ser exposta aos aPL circulantes.

A fosfatidilserina (PS) tem sido utilizada como antigénio alternativo, dado que a maioria dos ACA também se liga à PS, e esta, ao contrário da cardiolipina, encontra-se localizada nas membranas das células endoteliais e plaquetas, podendo ser mais facilmente exposta aos aPL.

No entanto, permanece a questão: poderá a PS constituir o antigénio fisiológico do *self*, para os aPL, uma vez que a PS é encontrada no lado interior das membranas celulares não activadas, e só é exposta aos anticorpos circulantes, após a activação celular que causa a sua transferência para o lado exterior.

Outros testes detectam anticorpos dirigidos contra a fosfatidiletanolamina, a qual se encontra tanto no lado interior como no lado exterior das membranas celulares e pode, portanto, ser exposta aos aPL circulantes¹¹.

É importante, ainda, notar que alguns trabalhos têm demonstrado que o plasma ou soro dos doentes com aPL têm aPL dirigidos contra PL, usualmente não ensaiados; o estudo único do ACA, para a detecção de doentes com APS, não permite a identificação de todos os doentes em risco.

Dá que se preconize uma análise dos aPL com um

painel de fosfolípidos apropriado, para aumentar a probabilidade de identificar os doentes com APS, e melhor correlacionar os resultados laboratoriais, com as manifestações clínicas⁷.

INTER-RELAÇÃO DOS SUB-TIPOS DE ANTICORPOS ANTI-FOSFOLÍPIDOS

Atente-se, nas associações observadas nos testes positivos para o anticoagulante lúpico e BFP-STS; nas associações entre os primeiros e os testes para anticorpos anti-cardiolipina; na demonstração da inibição da actividade anticoagulante lúpica, com a pré-incubação de soros positivos com o antigénio do VDRL e com lipossomas de cardiolipina. E ainda, no facto de que os testes do LA têm um acréscimo de sensibilidade, empregando baixas concentrações de fosfolípidos e podem ser neutralizados (ou por um fenómeno de *by-pass*) mediante a adição de uma concentração aumentada de fosfolípidos ou mediante o emprego de fosfolípidos da membrana plaquetária.

Tudo isto levou a pensar, inicialmente, que os anticorpos anti-fosfolípidos, com especificidade para com os fosfolípidos aniônicos, seriam os responsáveis pela actividade anticoagulante¹⁰.

No entanto, estudos subsequentes mostram que muitos doentes com testes LA positivos têm testes ACA negativos, verificando-se também o inverso. A identificação destes casos fez crer que a identidade comum perspectivada para os anticorpos detectados pelos testes do LA e pelos imunoensaios de fase sólida para os ACA, poderia ser mais complexa do que se esperava, e estes casos não eram explicados pela possibilidade avançada de diferentes sensibilidades dos testes¹².

Várias hipóteses foram avançadas para explicar estas aparentes diferenças entre anticorpos responsáveis pela actividade anticoagulante lúpica e anticorpos detectados nos ensaios de fase sólida²⁴.

Uma hipótese sugerida por Fleck et al, em 1988, seria a de que uma determinada percentagem dos soros dos doentes com LA tivessem anticorpos específicos para outros antigénios que não os fosfolípidos. O que sugere ser possível que outros anticorpos com outras especificidades, que não os fosfolípidos, poderiam ser os responsáveis pela actividade anticoagulante lúpica. Pelo que, ainda não está claramente definido se os anticorpos com especificidade para os fosfolípidos, não sejam os responsáveis, pelo menos nalguns casos, pela actividade anticoagulante lúpica²⁰.

Rauch et al, sugeriram que alguns anticorpos antifosfolípidos, com actividade LA, poderiam ligar-se aos fos-

folípidos num determinado estado conformacional e não noutra.

No seguimento das investigações relacionadas com o estudo da natureza dos antigénios alvo, reconhecidos pelos aPL, verificou-se que os LA reconhecem especificamente a estrutura hexagonal II (não bicamada) do fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE), mas não são capazes de reconhecer a estrutura lamelar (bicamada) do fosfolípido fosfatidiletanolamina²⁵.

À semelhança do que se passa com o reconhecimento e ligação do LA com a PE de fase hexagonal II, sugere-se que os ACA seriam capazes de reconhecer a molécula de cardioproteína num estado conformacional hexagonal característico e não noutra. Esta observação poder-se-ia também verificar com outros fosfolípidos aniónicos. E a demonstração de que a presença de concentrações adequadas de β 2-GP I são requeridas para a ligação dos aPL aos fosfolípidos adsorvidos no suporte sólido dos ELISA, sugere ser provável que a cardioproteína e outros fosfolípidos aniónicos sofram uma alteração conformacional, quando interagem com a β 2-GP I.

A estrutura resultante, eventualmente hexagonal característica, seria a conformação espacial dos antigénios fosfolípidos, que melhor se adapta ao reconhecimento e ligação do aPL^{26,27}.

β 2-GLICOPROTEÍNA I

De facto, foi recentemente observado, por vários grupos de cientistas, agindo independentemente uns dos outros, que para a detecção dos aPL, nos imunoenaios (ELISA), a presença de um cofactor plasmático proteico era essencial. Este cofactor, requerido para facilitar a ligação de alguns aPL aos fosfolípidos aniónicos, encontra-se presente no soro normal, e foi identificado como sendo a β 2-glicoproteína I (β 2-GP I) também designada apolipoproteína H^{28,29}.

A β 2-GP I, descoberta há mais de 30 anos, é uma glicoproteína de 50 Kd, cujo papel fisiológico é desconhecido. No entanto, o seu papel *in vivo* pode reflectir algumas das suas propriedades *in vitro*, a seguir mencionadas.

Uma das características da β 2-GP I ou Apo H, é a de que parece estar ligada ao sistema de transporte ou ao metabolismo dos triglicéridos, onde actua como activador da Lipoproteína Lipase (LPL). Esta proteína encontra-se no plasma, não associada a lípidos, mas apresenta uma elevada afinidade para os Quilomicra e emulsões ricas em triglicéridos.

A β 2-GP I é também um modulador da hemostase, *in vitro*, exercendo a sua acção a várias níveis: 1. Inibe a

fase de activação, por contacto, da via intrínseca da coagulação; 2. Inibe a reacção da protrombinase; 3. Inibe a agregação plaquetária induzida pelo ADP.

Ela liga-se a superfícies e moléculas carregadas negativamente, tais como o DNA, lipoproteínas plasmáticas, plaquetas, mitocôndrias, vesículas fosfolipídicas e à heparina. É uma proteína de ligação aos fosfolípidos (phospholipid binding protein).

Demonstrou-se, também, que a β 2-GP I se liga às plaquetas e é possível que se ligue a outros tipos de células, se a exposição de fosfolípidos aniónicos ocorrer na superfície celular³⁰.

Recentemente foi demonstrado que a β 2-GP I é um cofactor requerido para a ligação de alguns aPL aos fosfolípidos aniónicos²⁶. A ligação dos aPL, presentes nos distúrbios autoimunes aos PL, é mediada por este cofactor plasmático. Concentrações muito baixas de β 2-GP I permitem a ligação dos aPL de origem autoimune à CL adsorvida num suporte plástico. O modo segundo o qual esta glicoproteína medeia a ligação dos aPL aos PL, ainda não é conhecido.

ANTICORPOS ANTI- β 2-GLICOPROTEÍNA I

Este cofactor plasmático proteico poderia ser, segundo alguns autores, o verdadeiro antigénio alvo dos anticorpos. Esta hipótese seria sustentada, pela demonstração, em muitos doentes com aPL autoimunes e trombose, da existência de anticorpos anti- β 2-GP I no plasma, na ausência de fosfolípidos²⁷.

Quer a proteína, quer o PL podem sofrer alterações conformacionais e, deste modo, induzir a ligação dos aPL.

Por outro lado, diversos estudos parecem demonstrar que tanto os PL como a β 2-GP I são necessários para a ligação dos aPL, indicando, portanto, que os dois componentes constituem o epitopo, contra o qual estes anticorpos são dirigidos. Quer a proteína, quer o PL, podem sofrer alterações conformacionais e, deste modo, induzir a ligação dos aPL.

Sugeriu-se que este antigénio complexo poderia promover alterações conformacionais resultando na expressão de um epitopo no componente fosfolipídico ou proteico e, deste modo, induzir a ligação dos aPL.

Portanto, estes dados sugerem que, por um lado, a cardioproteína sofre uma alteração conformacional, quando interage com a apo H e altera a estrutura da cardioproteína da fase lamelar para a fase hexagonal II, e em alternativa, o antigénio complexo poderia exprimir um neoepitopo, no seu componente proteico. De facto este neoepitopo pode ser expresso, independentemente dos PL,

quando a β 2-GP I é adsorvida sobre placas de plástico com um componente hidrofílico mimetizando o próprio PL²⁷.

Portanto, até ao actual estado da investigação, três antigénios potenciais foram propostos: 1) A cardioplipina ou outro fosfolípido aniónico. 2) A molécula de b2-GP I nativa. 3) A β 2-GP I ligada a uma superfície com exposição de um neoepitopo.

Das três hipóteses, a última, crê-se ser a mais plausível, dado que foi recentemente reportado o achado de Ac anti- β 2-GP I em sistema ELISA, sem PL. E a irradiação das placas aumenta a reactividade do soro do doente para se ligar à β 2-GP I adsorvida às superfícies plásticas.

Estas descobertas sugerem a ligação da β 2-GP I a PL imobilizados ou a uma superfície de plástico aniónica, resultando numa reconfiguração da proteína com a exposição do neoepitopo¹⁰.

Estes achados demonstram que aPL são, de facto, Ac anti- β 2-GP I dirigidos contra um epitopo, o qual é expresso quando a β 2-GP I está ligada a fosfolípidos aniónicos ou a outra superfície apropriada. Por outras palavras, os anticorpos aPL e anti-B2GPI são dirigidos contra o mesmo antigénio, a β 2-GP I, a qual não é reconhecida quando ligada à heparina ou em solução, mas expressa um epitopo, quando ligado a PL ou adsorvido em superfícies adequadas²⁷.

Por outro lado, a caracterização de dois cofactores proteicos plasmáticos, que actuando independentemente um do outro, são necessários para a detecção da actividade anticoagulante lúpica, posteriormente identificados como sendo a β 2-GP I e a protrombina, tornou evidente que, os anticorpos que se ligam aos fosfolípidos, poderiam ser dirigidos para antigéneos complexos. Estes antigéneos complexos seriam compostos por fosfolípidos aniónicos e/ou fosfolípidos de fase hexagonal II, e proteínas plasmáticas com capacidade de ligação aos fosfolípidos, como é o caso da β 2-GP I, protrombina, proteína C e proteína S(13). De facto, há indicações de que estas e outras proteínas de ligação aos fosfolípidos, podem servir como cofactor para a ligação dos aPL³⁸.

Com base em todas estas observações, Pengo e outros²⁷ propõem-se reclassificar os aPL, reservando esta designação de anticorpos anti-fosfolípidos para as *reaginas* capazes de se ligarem directamente à cardioplipina. Anticorpos que reconhecem o epitopo da β 2-GP I não devem ser designados como aPL, mas sim como anticorpos anti- β 2-GP I, uma vez que a expressão identifica uma classe de anticorpos que prolonga os testes de coagulação dependentes dos PL e estão relacionados com fenómenos tromboembólicos.

Outros anticorpos com actividade anticoagulante lúpica (LA), mas sem actividade aPL no ELISA convencional, devem designar-se simplesmente LA. Estes anticorpos não se ligam às superfícies fosfolipídicas, via β 2-GP I, mas podem ser dirigidos contra complexos fosfolípidos protrombina, protrombina pura, ou a formas hexagonais de fosfolípidos zwitterionicos²⁷.

CLASSIFICAÇÃO DOS ANTICOAGULANTES LÚPICOS

Para a detecção da actividade anticoagulante lúpica, 2 cofactores foram identificados: protrombina e b2-GP I. Bevers e outros reportaram a necessidade de protrombina humana para demonstrar a actividade LA *in vitro*, na ausência de ligação aos fosfolípidos e independente da ligação à b2-GP I³¹. Trabalhos posteriores sugerem que a protrombina é o antigénio para a maioria das moléculas de IgG isoladas com actividade LA, especialmente na presença de fosfatidilserina e cálcio.

Portanto, nem todos os LA requerem a β 2-GP I como cofactor. Galli e Oosting sugerem que existem, pelo menos, dois tipos de LA. Um dependente da protrombina e outro dependente da b2-GP I. Ambos os cofactores actuam independentemente um do outro^{32,33}.

Por outro lado os LA podem ser divididos em, pelo menos, dois tipos, com base na sua capacidade de ligação aos fosfolípidos. Dos que se ligam aos fosfolípidos, a sua maioria requer a β 2-GP I. No entanto, o papel deste cofactor, na função deste LA, ainda não está estabelecido. Alguns estudos apontam no sentido de que anticorpos com actividade LA induzem e intensificam a actividade anticoagulante da β 2-GP I. Anticorpos dirigidos contra a β 2-GP I também parecem ter o mesmo efeito. Embora se saiba que a β 2-GP I inibe a fase de activação por contacto da coagulação, ainda não está confirmado se os anticorpos dirigidos contra esta proteína alteram esta função no mesmo sentido²⁰.

Isto levanta a questão de como a b2-GP I expressa a sua antigenicidade *in vivo*, e a de como a ligação de Ac específicos se relaciona com os fenómenos tromboembólicos.

Viard e outros encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre a presença de anticorpos anti- β 2-GP I, com actividade anti-fosfolipídica, e a ocorrência de trombose clínica.

Mais, se os anticorpos com actividade antifosfolipídica representam, de facto, anticorpos anti-b2-GP I, é interessante notar que Matsuura e outros demonstraram, que ao contrário dos ACA de origem autoimune, os ACA resultantes de infecções sifilíticas, ou outras, se ligam

aos fosfolípidos na ausência de β 2-GP I. Estas diferenças nos requerimentos de cofactor dos ACA de várias origens pode vir a explicar porque é que só os aCL de origem autoimune estão associados com trombose e abortos recorrentes.

E ainda, as várias propriedades da molécula de β 2-GP I poderão vir a explicar a actividade anticoagulante *in vitro*, versus anomalias pró-trombóticas observadas *in vivo*, em associação com os anticorpos LA de origem autoimune.

Um eventual mecanismo para o desenvolvimento de trombose, nestes doentes com anticorpos anti- β 2-GP I, com actividade antifosfolípídica, foi proposto por Triplett (em 1995), e envolve a capacidade dos aPL inibirem o efeito anticoagulante da β 2-GP I sobre a contribuição da plaqueta, para gerar o factor Xa. Isto resulta num aumento da geração de factor Xa, o qual predispõe à trombose. Paradoxalmente, os aPL parecem acentuar o efeito inibitório da β 2-GP I, na reacção da protrombinase, *in vitro*¹⁰.

Portanto, parece que existem várias classes de LA, e é pouco provável que estes diferentes subtipos de LA se comportem da mesma maneira, nos vários testes de coagulação, habitualmente usados para a investigação do LA. (Quadro I)

Quadro I - Subclassificação dos inibidores dos testes de coagulação, dependentes dos fosfolípidos (todos os LA), segundo os novos critérios, proposta por Galli, Bevers e modificada por Exner³⁴.

	Características	Função
Anticorpos LA	Não se liga a PL	Inibe a coagulação dependente dos PL por interacção com a protrombina
ACA	Liga-se aos PL	Aumenta a ligação da β 2-GP I aos PL, estimulando a actividade anticoagulante
Anti- β 2-GP I	Não se liga a PL	Reconhece a β 2-GP I e aumenta a sua actividade anticoagulante
"Verdadeiros" aPL	Liga-se a PL	Reconhece os PL procoagulantes independentemente de qualquer cofactor

Investigando se outras proteínas de ligação aos fosfolípidos poderiam servir como cofactor para a ligação dos aPL, identificaram-se aPL dirigidos contra a combinação de fosfolípidos e proteína C e, contra fosfolípidos e proteína S³⁵.

Esta descoberta, (de que os antígenos contra os quais os aPL são dirigidos, não são unicamente fosfolípidos, mas sim antígenos complexos, compostos por fosfolípidos aniónicos e/ou fosfolípidos de fase hexagonal, e proteínas plasmáticas com capacidade de ligação aos fosfolípidos, tais como a β 2 Glicoproteína I, protrombina, proteína C e proteína S), revelou-se de extrema importância.

Esta evidência sugere que a designação mais apropriada para esta família de anticorpos é a de Ac anti-fosfolípido-proteína¹⁰.

OCORRÊNCIA DOS aPL

Uma vez que a detecção dos aPL depende, por um lado, dos métodos utilizados, e por outro, dos grupos de doentes estudados, é importante considerar as condições clínicas que apresentam os doentes com estes aPL. Se bem que, inicialmente, os aPL fossem encontrados em doentes com LES, está actualmente estabelecido, que estes anticorpos ocorrem numa grande variedade de distúrbios²⁰.

Assim, os aPL podem ser detectados em alguns indivíduos normais, em cerca de 40 % das doenças autoimunes (Lupus Eritematoso Sistémico, Artrite Reumatóide, etc...), num grande número de doenças infecciosas, (virais incluindo HIV1 e HBV, infecções bacterianas e fúngicas), em distúrbios induzidos por drogas, e em doenças malignas.

Love e Santoro apresentam uma distribuição de frequências dos LA,³⁶ nas suas associações clínicas mais típicas (Quadro II).

Quadro II - Condições clínicas associadas com LA (retirado de Love e Santoro³⁶)

Condição	distribuição (%)
Lupus Eritematoso Sistémico	35
Doenças linfoproliferativas	4
Outras doenças autoimunes (incluí Artrite Reumatóide)	9
Reacções a drogas	12
Infecções	3
Cardiovascular	15
Doenças Malignas	3
Outras (incluindo indivíduos normais)	19

Uma classificação simples, proposta por Triplett (1995), consiste em agrupar estas imunoglobulinas em 2 grupos, designadamente autoimunes ou alloimunes, de acordo com as situações clínicas em que ocorrem. (Quadro III) Será interessante notar, à luz desta classificação, que os aPL autoimunes frequentemente têm sintomas clínicos associados, enquanto os doentes com aPL alloimunes são tipicamente assintomáticos¹⁰.

Quadro III - Classificação dos aPL (proposta por Triplett¹⁰)

1) Autoimune	
a) Primário	Não preenche os critérios do LES
b) Secundário	LES
	Outras doenças do tecido conectivo
c) Induzido por drogas	Fenotiazinas
	Quinidina
	Quinina
	Penicilinas sintéticas
	Hidralazina
2) Alloimune	
a) Infecções	Virais
	Bacterianas
	Fúngicas
	Protozoários
b) Malignas	Hairy cell leukemia
	Linfoproliferativas

SÍNDROMA ANTIFOSFOLÍPIDO -PROTEÍNA

A associação entre trombose e aPL foi primeiro observada e descrita por Bowie et al, em 1963⁴. Um grande número de estudos posteriores confirma a associação entre a presença de aPL e a doença tromboembólica.

O conceito de Síndrome Antifosfolípido (APS) surgiu com o reconhecimento de um grande número de doentes, que apresentam episódios de trombose arterial e/ou venosa recorrentes, abortos de repetição, mortes fetais recorrentes (com trombose placentar) e trombocitopenia, em associação com um teste laboratorial para o LA e/ou ACA positivo⁸.

Harris et al, em 1987, agruparam estes doentes sob a designação de *Síndrome antifosfolípido-proteína*, e propuseram os critérios necessários para estabelecer o diagnóstico do APS. A expressão, *Síndrome antifosfolípido-proteína*, pretende identificar os doentes que apresentam manifestações clínicas significativamente associadas aos aPL, - trombose, aborto fetal ou trombocitopenia. Os critérios para o *Síndrome antifosfolípido-proteína*, definidos por Harris, compreendem os achados

clínicos já referidos, e achados serológicos que englobam a presença de um anticoagulante lúpico positivo e/ou um teste de aCL do isotipo IgG ou IgM positivo, ou de elevado título. (Quadro IV) Os doentes, com Síndrome antifosfolípido-proteína deverão ter, pelo menos, uma manifestação clínica e um achado laboratorial, durante a sua doença. O teste dos aPL deverá ser positivo, em pelo menos duas ocasiões, separadas por um intervalo de mais de 8 semanas.

As unidades GPL e MPL referem-se aos padrões propostos por Harris et al⁸.

Quadro IV - Critérios para o Síndrome antifosfolípido-proteína (quadro retirado de Harris⁸)

Achados clínicos	Achados laboratoriais
Trombose venosa	Ac anti-cardiolipina IgG (» 10 unidades GPL)
Trombose arterial	Anticoagulante lúpico positivo
Morte fetal recorrente	Ac anti-cardiolipina IgM (» 10 unidades MPL)
Trombocitopenia	e teste LA positivo

Em muitos dos casos descritos inicialmente, o síndrome ocorria sobre o cenário de um LES. Uma constelação similar, dos achados clínicos e laboratoriais do APS, era observada em alguns doentes sem doença sistémica subjacente¹².

Vários autores confirmaram, que uma grande proporção de doentes, que se enquadra perfeitamente neste síndrome antifosfolípido, não sofriam de um LES clássico, nem tinham qualquer manifestação clínica major ou serológica do lupus. Estes doentes são reconhecidos como tendo um Síndrome antifosfolípido-proteína primário ou PAPS. No entanto, alguns doentes, com PAPS, podem progredir mais tarde para um LES.

Apresentando algumas diferenças, do ponto de vista clínico, a igual prevalência de eventos tromboembólicos, abortos recorrentes e trombocitopenia, torna similares os doentes com APS e PAPS¹⁰.

BIBLIOGRAFIA

- HARRIS E N, GHAVARI A E, HUGHES GRV: Anti-phospholipid antibodies. Clin Rheum Dis 1985; 11: 591-609
- CONLEY L, HARTMANN RC: A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. J Clin Invest 1952; 31: 621-622
- FEINSTEIN DI, RAPAPORT SI: Acquired inhibitors of blood coagulation. In: Progress in Haemostasis and Thrombosis. T.N. Spaet (Ed.) New York: Grune and Stratton 1972; pp. 75-95
- BOWIE W EJ, THOMPSON JH, PASCUZZI CA, OWEN CA: Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. J Clin Invest 1963; 62: 416-430
- NILSSON IM, ASTED B, HEDNER U, BEREZIN D: Intrauterine

- death and circulating anticoagulant (*antithromboplastin*). *Acta Med Scand* 1975;197: 153-159
6. HARRIS EN, GHAVARI A E, BOEY ML et al: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; ii: 1211-1214
 7. HARRIS EN, GHAVARI AE, ASHERSON RA HUGHES GRV: Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 1-6
 8. HARRIS EN: Syndrome of the black swam. *Br J Rheumatol* 1987; 26: 324-326
 9. MEYER D: Phospholipid-binding antibodies and thrombosis: Introductory remarks. *Int. Symposium on Phos. binding Ab* 1993;
 10. TRIPLETT DA: Protein Clinical presentation of Antiphospholipid-Protein Antibodies (APA). *Thromb Haemost* 1995; 74(1): 329-337
 11. HARRIS EN: *Annotation - Antiphospholipid antibodies*. *Br J Haematol* 1990; 74: 1-9
 12. HARRIS EN, ASHERSON RA, HUGHES GRV: Antiphospholipid antibodies- auto antibodies with a difference. *Ann Rev Med* 1988; 39: 261-71
 13. GROOT PG, OOSTING JD, DERKSEN HWM: Pathophysiological concepts for the increased risk for thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *Int. Symposium on Phos. binding Ab* 1993;
 14. LECHKNER K: *Lupus anticoagulants and thrombosis in Thrombosis and Haemostasis*. Verstraete M., Vermeylen J., Lijnen R., Arnout J., Leuven: Leuven University Press 1987; 525-547
 15. CAMPBELL A L, PIERANGELI SS, WELLHAUSEN S, HARRIS EN: Comparison of the Effects of Anticardiolipin antibodies from Patients with Antiphospholipid Syndrome and with Syphilis on Platelet Activation and Aggregation. *Thromb Haemost* 1995; 73 (3): 529-34
 16. KOIKE T, SUEISHI M, FUNAKI H, YOSHIDA TS: Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 193-199
 17. FEINSTEIN DI: Lupus anticoagulant, Thrombosis and Fetal loss. *N Engl J Med* 1985; 313: 1348-50
 18. LUBE WF, LIGGINS GC: Lupus anticoagulant and pregnancy. *AM J Obstret Gynecol* 1985; 153: 322-7
 19. BRANCH WB, SCOTT JR, KOCHENOUR NK, HERSHGOLD E: Obstretic Complications associated with Lupus anticoagulant. *N Engl J Med* 1985; 313: 1322-5
 20. EXNER T: Diagnostic Methodologies for Circulating Anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74(1): 338-344
 21. TRIPLETT DA, BRANDT JT, MASS RL: *The laboratory heterogeneity of lupus anticoagulants*. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 946-951
 22. LOIZOU S, McCREA JD, RUDGE AC, REYNOLDS R, CATHERINE C, HARRIS EN: Mesurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 738-745
 23. AMIRALJ, MINARD F, CHAMBRETTE B: Development of standardized immunoassays for identification, characterization and quantitation of antiphospholipid antibodies (APA). *Biol Clin Hematol* 1991; 13: 81-88
 24. TRIPLETT DA, BRANDT JT, MUSGRAVE KA, ORR CA: The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid. *JAMA* 1988; 259: 550-554
 25. RAUCH J: Structural basis of phospholipid antigenicity. *Int. Symposium on Phos. binding Ab* 1993;
 26. Mc NEIL HP, SIMPSON RJ, CHESTERMAN CN, KRILIS SA: Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes lipid binding inhibitor of coagulation: β 2 Glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4
 27. PENGO V, BIASIOLO A, FIOR MG: Autoimmune Antiphospholipid Antibodies are directed against a Cryptic Epitope Expressed when B2 Glycoprotein I is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost* 1995; 73 (1): 29-34
 28. HARRIS EN, PIERANGELI SS, BARQUINERO J, ORDI J: Anticardiolipin antibodies and binding of anionic phospholipid and serum protein. *Lancet* 1990; 336: 505-506
 29. GALLI M, CONTOURIUS P, MAASEN C et al: Anticardiolipin antibodies directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-1547
 30. Mc NALLY T, COTTEREL SE, MACKIE IJ, ISENBERG DA, MACHIN S J: The interaction of B2 Glycoprotein I and heparin and its effect on B2 Glycoprotein I Antiphospholipid Antibodies Cofactor Function in Plasma. *Thromb Haemost* 1994; 72 (4): 578-81
 31. BEVERS EM, GALLI M, BARBUI T, COMFURIUS O, ZWALL R F A: Lupus anticoagulants IgG's (LA) are not directed to phospholipid only but to a complex of lipid bound prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-32
 32. OOSTING JD, DERKSEN RHWM, ENTJES HTI, BOUMA BN, GROOT P G: Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of B2 Glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1992; 67: 499-502
 33. GALLI M, COMFURIUS P, BARBUI T: Anticoagulant activity of B2 Glycoprotein I is potentiated by a distinct sub-group of antibodies. *Thromb Haemost* 1992; 68: 297-300
 34. GALLI M, BEVERS EM: Inhibition of phospholipid-dependent coagulation reactions by *Antiphospholipid Antibodies*: Possible mechanisms of action. *Lupus* 1994; 3: 223-228
 35. OOSTING J D, DERKSEN R H W M, BOBBICK I W G, HACKENG TM, BOUMA BN, De GROOT PG: Antiphospholipid Antibodies directed against a combination of phospholipid with prothrombin, protein C or protein S. An explanation for their pathogenic mechanism. *Blood* 1933; 81: 2618-2625
 36. LOVE PE, SANTORO SA: Antiphospholipid Antibodies: Anticardiolipin and lupus anticoagulant in Systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. *Ann Int Med* 1990; 112: 682-698
 37. BRANDT JT, BARNA LK, TRIPLETT DA: Laboratory Identification of Lupus Anticoagulants: Results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74(6): 1597-1603
 38. SOUSA JC, CARRIÇO F: Síndrome de Imunização Antifosfolípídica e Trombose. *Acta Méd Portug* 1994; 7: 635-638