

# SÍNDROME DE IMUNIZAÇÃO ANTIFOSFOLIPÍDICA E TROMBOSE

J. CARVALHO DE SOUSA, FÁTIMA CARRIÇO

Instituto de Trombose e Hemostase. Laboratório de Hematologia. Hospital de Santa Maria. Lisboa.

## RESUMO

O termo de *Síndrome Antifosfolipídica*, introduzido por Harris em 1987, designa uma entidade clínica caracterizada pela presença de anticorpos anticardiolipina e/ou anticoagulante lúpico, associados a fenómenos de trombose. Progressos recentes revelam que os antígenos que induzem os anticorpos são complexos de fosfolípidos e proteínas, tornando-se evidente a presença de um cofactor proteico para a formação e acção dos Anticorpos antifosfolípidos (APL). Neste trabalho faz-se uma revisão dos conceitos actuais sobre a natureza e especificidade dos APL, apresentando-se a sua descrição de acordo com a parte proteica implicada. A sua acção é condicionada pelas funções específicas das proteínas associadas aos fosfolípidos como a Beta2-Glioproteína 1, a Protrombina, as Proteínas c e s, Anexina V e associação do t-PA e plasminogénio. O isotipo dos APL é também heterogénio. Detectaram-se APL pertencentes às classes IgG, IgM e IgA, podendo também coexistir no mesmo doente e não sendo possível associar uma classe específica a uma evolução clínica particular. Estes aspectos justificam a variabilidade clínica encontrada neste síndrome e também a variabilidade dos testes laboratoriais. Para o diagnóstico laboratorial, foram desenvolvidos sistemas de micro ELISA que permitem a identificação de imunoglobulinas dirigidas contra os fosfolípidos em fase hexagonal. Esta metodologia é sensível e específica para a detecção de APL. Finalmente, sintetiza-se a expressão clínica mais comum, salientando-se os aspectos fundamentais do diagnóstico clínico-laboratorial do Síndrome de Imunização Antifosfolipídica.

## SUMMARY

### Antiphospholipid syndrome and thrombosis.

The designation of *Antiphospholipid Syndrome* was first applied by Harris in 1987, to a clinical status characterized by the detection of anticardiolipin and/or lupus anticoagulant with clinical thromboembolic manifestations. Recent advances in its study has shown that the inducing antigen is really a complex of phospholipid and protein. Therefore, it became clear that there is a need for a protein cofactor to the formation and action of antiphospholipid antibodies (APL). The authors present a detailed revision of the nature and specificity of APL, described as its proteic counterpart. Their action is surely conditioned by the specific protein involved with phospholipids, as it may be with Beta2-Glycoprotein 1, Prothrombin, Protein c and s, Anxin V and the association of plasminogen and t-PA. The isotype of immunoglobulins is also very heterogenous, since it was detected as IgG as well as IgA and IgM immunoglobulins. Furthermore, they can coexist in the same patient and with no clear relationship with thromboembolic manifestations. These aspects demonstrate well the greater variability that is found in these patients in relation to clinical and laboratory manifestations of the disease. For laboratory diagnosis, micro ELISA systems were developed, allowing the identification of antiphospholipid immunoglobulins with relative specificity and accuracy. Finally, the most frequent clinical expression is described, emphasising the pitfalls of clinical and laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome.

## INTRODUÇÃO

O termo de *Síndrome Antifosfolipídica* foi primeiramente introduzido por Harris et al. em 1987<sup>1</sup> para designar uma entidade clínica caracterizada pela presença de anticorpos anticardiolipina e/ou anticoagulante lúpico,

associados a fenómenos de trombose. Reconhece-se hoje que esta entidade corresponde a um conjunto mais extenso de situações patológicas, tendo por base a imunização antifosfolipídica<sup>2</sup>.

Estes anticorpos antifosfolípidos (APL) são auto-anticorpos<sup>3</sup> que podem ser detectados no plasma pelo pro-

longamento dos testes da coagulação dependentes de fosfolípidos (anticoagulante lúpico) (AL) ou por métodos imunológicos de fase sólida (anticardiolipina, VDRL, etc.). Contudo, nem todos os doentes apresentam o mesmo tipo de anticorpo, sendo evidente que estes anticorpos que se ligam aos fosfolípidos constituem de facto um conjunto heterogénio de imunoglobulinas<sup>4</sup>. Os métodos imunológicos de fase sólida, usando fosfolípidos aniónicos imobilizados, na maioria cardiolipina ou fosfatidilserina, ou ainda fosfatidilserina em fase hexagonal (hexagonal II, camada simples), permitem detectar estes anticorpos. Por outro lado, comprovou-se que a estrutura lamelar dupla dos fosfolípidos (fosfatidiletanolamina) não é reconhecida<sup>5,6</sup>.

Alguns destes anticorpos exibem uma actividade anticoagulante *in vitro*, nos testes da coagulação dependentes de fosfolípidos, sendo designados por *anticoagulantes de tipo lúpus*, porquanto foram inicialmente descritos no Lupus Eritematoso Sistémico.

É conhecido que o potencial catalítico dos fosfolípidos aniónicos na coagulação se deve fundamentalmente à sua capacidade para reunir os factores dependentes da vitamina K em complexos. Será pois compreensível que os anticorpos que inviabilizam a utilização desta superfície fosfolipídica actuem como anticoagulantes. Permaneceu contudo por explicar a fisiopatologia dos processos de trombose que caracterizam a evolução clínica destes doentes.

### Natureza dos Antígenos e dos Anticorpos

Os progressos mais recentes neste domínio ficaram a dever-se à descoberta de que os antígenos contra os quais os APL são dirigidos, não são fosfolípidos isolados, mas sim complexos de fosfolípidos e proteínas associadas aos fosfolípidos<sup>7</sup>. Em 1990 foi descrito que a detecção de APL, por método ELISA, exigia a presença de um cofactor, a Beta2-Glicoproteína 1 (Apolipoproteína H)<sup>8</sup>. A detecção de AL exigia também a presença de outro cofactor, a Protrombina<sup>9</sup>. Alguns dos doentes com AL poderiam portanto ter anticorpos contra complexos Fosfolípidos/beta2-Glicoproteína 1, ou contra complexos de fosfolípidos/protrombina. Em alguns casos poderiam existir ambos estes anticorpos. Mais tarde, foram também detectados anticorpos contra complexos de Fosfolípidos/Proteína c e Fosfolípidos/Proteínas<sup>10</sup>. Outras evidências apontam para a necessidade de outros cofactores como a Fosfolipase A2, a Trombomodulina e a Anexina V, para a ligação aos fosfolípidos<sup>11</sup>. A Anexina V (ou anticoagulante proteico placentário I ou ainda anticoagulante alfa-vascular) é uma proteína de fixação de cálcio e de fosfolípidos com alta afinidade para a fosfatidilserina e responsável por uma actividade anticoagulante potente<sup>12</sup>. A Anexina V fixa-se à membrana plaquetária após vesiculação e exposição de fosfatidilserina, durante a activação plaquetária. Foi até utilizada em citofluorometria para monitorizar a exposição plaquetária de fosfatidilserina durante a activação, podendo correlacionar-se com a secreção de GMP-140. O ataque das plaquetas pelos componentes C5b-C9 do complemento também produz exposição de fosfatidilserina, como pode

sucedem nos processos inflamatórios agudos, provocando também fixação da Anexina V. Assim, esta proteína seria um anticoagulante fisiológico, neutralizando as superfícies pró-coagulantes geradas no decurso de activações celulares múltiplas (células endoteliais, plaquetas e monocitos) e impedindo a formação de complexos amplificadores da coagulação<sup>13</sup>.

Tornou-se portanto evidente que a presença de um cofactor proteico para a formação e acção dos APL é fundamental. A classificação destes APL poderá então ser feita de acordo com a parte proteica implicada, o que justificaria também a sua acção, condicionada pela função específica da proteína associada aos fosfolípidos (*Quadro 1*).

Assim, os APL poderiam ser dirigidos contra antígenos complexos, compostos por fosfolípidos aniónicos ou fosfolípidos em fase hexagonal e dirigidos contra proteínas plasmáticas com capacidade de fixação de fosfolípidos como a Beta2-Glioproteína 1, a Protrombina, as Proteínas c e s, Anexina V e associação do t-PA e plasminogénio (*Quadro 1*). A explicação dada a este fenómeno biológico veio das experimentações feitas no animal<sup>14</sup>, que sugerem por exemplo que a cardiolipina sofre uma modificação de conformação quando interage com a Beta2-glicoproteína 1 e que a estrutura resultante apresenta o epitopo imunogénico que induz a produção de anticorpos anticardiolipina. Seriam pois as diferentes associações de fosfolípidos e proteína que apresentariam os epitopos reconhecidos pelos APL.

### Quadro 1

Proteína Associada	Acção dos APL Induzidos
Beta2-Glicoproteína 1	Prolongamento dos testes coagulação
Protrombina	Prolongamento dos testes coagulação
Proteína c	Trombose arterial ou venosa
Proteína s	Trombose arterial ou venosa
Anexina V	Trombocitopénia, Trombose
t-PA/ (?)	Hipofibrinólise
TxA2/PGI2 (?)	Hiperactividade plaquetária

Finalmente, para explicar a ocorrência de APL *in vivo*, tem sido proposto que estruturas fosfolipídicas em monocamada ou camada simples podem formar-se *in vivo* devido a perda da organização normal das membranas celulares e induzir anticorpos antifosfolipídicos associados a doença auto-imune<sup>15,16</sup>. Tais perturbações podem suceder por excessiva destruição ou lesão plaquetária, incluindo a activação das plaquetas, activação monocitária ou mesmo das células endoteliais.

O isotipo dos APL é também heterogénio. Foram detectados APL pertencentes às classes IgG, IgM e IgA<sup>17</sup>. Várias classes de imunoglobulinas podem também coexistir no mesmo doente, não sendo possível associar uma classe específica a uma evolução clínica particular.

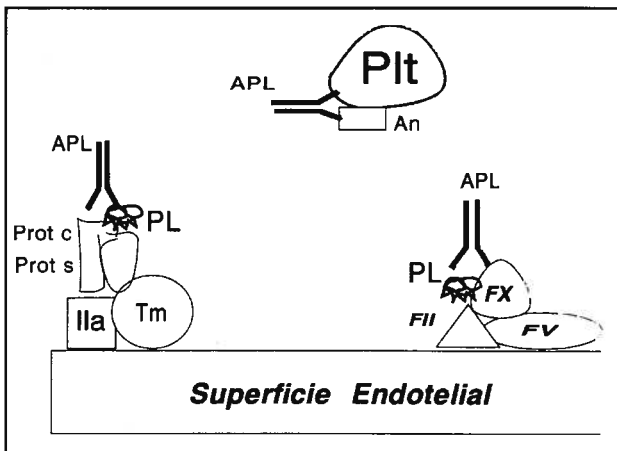
### Fisiopatologia dos Processos Trombóticos

Durante o processo de hemostase formam-se vários complexos enzimáticos, que podem ser interpretados

como sistemas de amplificação das reacções da coagulação. Em qualquer destes complexos entram proteínas dependentes da vitamina K, cuja capacidade de fixação às superfícies aniónicas é bem conhecida.

A actividade enzimática dos factores isolados é escassa e insuficiente para provocar o desenvolvimento da formação de fibrina. Reunidos numa superfície aniónica apropriada, a eficácia e velocidade das reacções aumentam consideravelmente, proporcionando o mecanismo necessário para a continuidade do circuito da coagulação<sup>18</sup>.

Na realidade a base comum a todos estes amplificadores é a presença de uma membrana celular activada à superfície da qual enzimas, cofactores e substratos se combinam para formar os catalizadores activos (*Figura 1*).



*Fig. 1* – Esquema diagramático dos complexos moleculares pró-coagulantes e antitrombóticos. Fisiopatologia da acção dos APL.

Em cada um deles, uma protease da serina combina-se com um cofactor associado à membrana para formar o enzima catalítico activo. O mesmo se passa com a formação de complexos inibidores da coagulação, nomeadamente na activação da Proteína c e na inactivação dos Factores Va e VIIIa pela Proteína c activada.

Fisiologicamente, esta superfície fosfolipídica aniónica pode ser fornecida pela membrana plaquetária, mas também pode ser apresentada em alguns casos pelas células endoteliais, monocitos ou fragmentos vesiculados de membranas celulares<sup>18</sup>.

Os APL podem portanto interferir com qualquer destes processos dependentes de fosfolípidos. Consoante o epítipo que lhes deu origem, assim se obterá uma diferente especificidade de acção. Este aspecto justifica a variabilidade encontrada neste síndrome e também a variabilidade dos achados clínico-laboratoriais.

Os doentes que não apresentam APL de especificidade dirigida aos complexos de acção antitrombótica, podem ter um AL em circulação e serem menos propensos a trombose<sup>19</sup>. Estes doentes teriam APL de especificidade dirigida a complexos com acção pró-coagulante. É possível que nestes casos só se venham a desenvolver processos trombóticos quando os APL de especificidade anti-Pc/Tm, anti-APc/Ps, anti-PGI<sub>2</sub>/TxA<sub>2</sub> ou anti-tPA/Plmg aparecem.

## Métodos de Diagnóstico Laboratorial

Os anticoagulantes de tipo Lupus (LA) foram durante algum tempo uma perturbação apenas laboratorial, sem qualquer significado clínico, já que estes doentes não apresentavam hemorragias, apesar do prolongamento do APTT. Actualmente sucede um pouco o inverso, tendo as várias casas comerciais proposto vários reagentes, com sensibilidade acrescida para o LA. Por outro lado, desde que se soube que a maioria destes doentes apresentam também anticorpos anticardiolipina (ACA), esta determinação passou também a fazer parte da investigação laboratorial destes doentes. Actualmente, estes dois testes revelam cerca de 60% de concordância. Nos outros 40% pode estar presente qualquer deles isoladamente. Contudo, a presença de ambos os anticorpos não parece aumentar o risco de trombose<sup>20</sup>.

A primeira atitude no diagnóstico laboratorial de APL é pois o estudo do plasma do doente com um teste de rastreio, suficientemente sensível<sup>20</sup>. A maioria dos laboratórios utiliza o APTT com reagente sensível ao AL. Mesmo sendo negativo este resultado deve ser confirmado por outro teste de *screening*, como o APTT com outro reagente, o KCT ou dRVVT. Se estes são também negativos deve passar-se à determinação dos ACA por método imunológico de fase sólida.<sup>21</sup> (*Quadro 2*).

Se o primeiro teste é anormal, a investigação prossegue com a demonstração da existência de um inibidor. A maioria fá-lo com testes de diluição. Nestes testes deve misturar-se 3/4 do plasma doente com 1/4 plasma normal e repetir o APTT. Uma correcção significa défice de factores enquanto que a ausência de correcção significa normalmente a presença de um inibidor (*Quadro 2*). Ocasionalmente pode suceder um prolongamento paradoxal do teste por efeito de um LA dependente do tempo, tendo então o plasma normal um efeito de cofactor do LA<sup>22</sup>.

### Quadro 2 – Meios Diagnósticos para Anticoagulante Lúpico

A P T T	
APTT, TCK, dRVVT	Estudos de mistura
ACA	APTT (Plasma doente + Normal)
	Confirmar especificidade APL
	APTT diluído, Inibição FT
	Neutralização plaquetária
	Liposomas de fosfatidilserina
	ELISA - APL com FL fase hexagonal

Uma vez demonstrada a presença de inibidor é preciso caracterizá-lo como dependente de fosfolípidos. Para isso podem usar-se três metodologias<sup>23</sup>. A primeira consiste em diminuir a quantidade de fosfolípido presente para aumentar o efeito inibidor do LA. É o caso do APTT diluído ou da inibição com tromboplastina tecidual. No segundo caso, faz-se o aumento dos fosfolípidos para neutralizar o anticorpo presente. São os casos da neutralização com extratos plaquetários, com liposomas de fosfatidilserina,

etc. Outra possibilidade é utilizar fosfolípidos em fase hexagonal adquiridos comercialmente para inibir a actividade do LA. Este último teste é talvez o mais específico e o mais sensível para o diagnóstico de LA.

Mais recentemente foram desenvolvidos sistemas de micro ELISA que permitem a identificação de imunoglobulinas dirigidas contra os fosfolípidos em fase hexagonal, adsorvido sobre suporte sólido. Esta possibilidade é também de igual forma sensível e específica para a detecção de APL.

### Expressão Clínica do Síndrome APL

Existe claramente uma estreita associação entre os APL e complicações tromboembólicas. Estas ocorrem tanto nos territórios venosos como arteriais e também como enfarte placentário ou vasculopatia trombótica placentárias durante a gravidez<sup>24</sup>. A perda fetal, sobretudo os abortos de repetição são frequentes. Outros casos, cursam com trombocitopénias que podem ser graves. Assim, a detecção de APL no plasma passou a considerar-se como um *marcador* de elevado risco trombótico.

Os conhecimentos mais recentes expostos anteriormente permitem explicar que o risco trombótico não seja determinado pela interferência com um processo metabólico específico, mas sim que diferentes tipos de APL induzidos por diferentes associações de fosfolípido/proteína (*Quadro 1*) possam interferir com diferentes mecanismos antitrombóticos, todos eles levando então á trombose. A presença de subclasses de APLs também explica a grande variabilidade na correlação entre APL e trombose porque os processos trombóticos e um teste positivo para AL são provocados por diferentes anticorpos.

Cada doente com APL positivo terá portanto um conjunto próprio de anticorpos contra associações específicas de fosfolípido/proteína, e este conjunto determina o seu risco trombótico particular<sup>25</sup>. Assim, também se compreende a grande variabilidade clínica de expressão do síndrome APL.

Os APL estão presentes num elevado número de situações, como as infecções, inflamação, doença auto-imune e neoplasias<sup>26</sup>. Contudo actualmente considera-se que os APL devem ser vistos como uma situação clínica propensa a trombose, na qual, uma segunda entidade patológica como as infecções, traumatismos, cirurgia ou a gravidez provocaria a trombose.

De qualquer forma não é ainda possível estabelecer qual a percentagem de doentes com APL positivo que vão desenvolver processos trombóticos<sup>27</sup>. De igual modo não existe também nenhum teste laboratorial que permita identificar o conjunto de doentes mais propensos a trombose. Talvez que num futuro próximo o aperfeiçoamento da especificidade do estudo biológico venha a permitir identificar estes grupos de risco acrescido.

### BIBLIOGRAFIA

1. HARRIS EN: The antiphospholipid syndrome. An introduction. In: Harris EN, Exner T, Hugues GV, Asherson RA: Eds. Phospholipid binding antibodies. CRC Press, Boston 1991; 373-376.

2. ASHERSON RA: Primary antiphospholipid syndrome In: Harris EN, Exner T, Hugues GV, Asherson RA, Eds. Phospholipid binding antibodies, 1991; 378-386.
3. LOVE PE, SANTORO SA: Antiphospholipid antibodies Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in Systemic Lupus Erythematosus and non SLE disorders. *Ann Int Med* 1990;112:682-698.
4. ALVING BM: Lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies and the antiphospholipid syndrome. Loscalzo J, Schafer AI, Ed. Blackwell Scientific Pub. London In: Thrombosis and Haemorrhage 1994; 749-766.
5. ARNOU J, HUYBRECHTS E, VANRUSSELT M, VERMYLEN J: A new lupus anticoagulant neutralization test based on platelet derived vesicles. *Br J haematol* 1992; 80: 341-346.
6. HARRIS EN: Annotation Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990; 74: 1-9.
7. BEVERS E M, GALLI M: Cofactors involved in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1992; 1: 51-53.
8. BEVERS EM, GALLI M, BARBUI T, COMFURIUS P, ZWAAL RFA: Lupus anticoagulant IgG (LA) are not direct to phospholipids only but a complex of lipid bound Prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-632.
9. VERMYLEN J, ARNOU J: Is the antiphospholipid syndrome caused by antibodies directed against physiologically relevant phospholipid protein complexes? *J Lab Clin Med*, 1992; 120: 10-12.
10. CARIOU R, TOBELEM G, BELLUCCI S: Effect of lupus anticoagulant on antithrombogenic properties of endothelial cells. Inhibition of thrombomodulin dependent protein c activation. *Thromb haemost* 1988; 60: 54-58.
11. GALLI M, COMFURIUS P, MAASSEN C: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-1547.
12. ASHERSON RA, CERVERA R: The antiphospholipid syndrome: A syndrome in evolution. *Ann Rheumatic Dis* 1992; 51: 147-150.
13. GROOT PG, OOSTING JD, DERKSEN HW: Pathophysiological concepts for the increased risk for thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *Int Symposium on Phos binding Ab* 1993.
14. MCNEIL HP, SIMPSON RJ, CHESTERMAN CN, KRILIS SA: Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation. Beta2 glycoprotein I (Apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.
15. RAUCH J: Structural basis of phospholipid antigenicity. *Int. Symposium on Phos binding Ab* 1993.
16. RAUGH J, JANOFF AS: Phospholipid in the hexagonal phase is immunogenic:evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4112-4114.
17. TRIPLETT DA, BRANDT JT, MAAS RL: The laboratory heterogeneity of lupus anticoagulants. *Arch Pathol Lab med* 1985; 109: 946-951.
18. MANN KG: The role of membrane lipid in blood coagulation. *Int. Symposium on Phos. binding Ab* 1993.
19. ASHERSON RA: Antiphospholipid antibodies. Clinical complications referred in medical literature. In: Harris EN, Exner T, Hugues GV, Asherson RA: Eds. Phospholipid binding antibodies 1991; 388-402.
20. TRIPLETT DA: Coagulation assays for the Lupus Anticoagulant. Review and critique of current methodology. *Stroke*. 1992; 23(1): i11-i14.
21. TRIPLETT DA: Laboratory investigation of phospholipid binding antibodies and lupus anticoagulants. *Int. Symposium on Phos. binding Ab*. 1993.
22. SIE P: Rationale of the standardization of the detection of lupus anticoagulants. *Int. Symposium on Phos. binding Ab* 1993.
23. EXNER T, TRIPLETT DA, TABERNER D, MACHIN SJ: Guidelines for testing and revised criteria for Lupus Anticoagulant. SSC subcommittee for the standardization of Lupus Anticoagulants. *Thromb Haemost* 1991; 65: 320-322.
24. SOULIER JP, BOFFA MC: Avortements a repetition, thromboses et anticoagulant circulant anti-thromboplastine. Trios observations. *Nouv. Pres Medicale* 1980; 9: 859-864.
25. The antiphospholipid antibodies in Stroke Study Group 1990. Clinical and laboratory findings in patients with antiphospholipid antibodies and cerebral ischemia. *Stroke*, 1990; 21: 1268-1273.
26. TRIPLETT DA: Lupus anticoagulants and thrombosis. In: Thrombosis and its management. Poller L, Thomson J, Ed. Churchill Livingstone. NY 1993; 98-112.
27. TOBELEM G: The antiphospholipid syndrome. *Int. Symposium on Phos. binding Ab* 1993.