

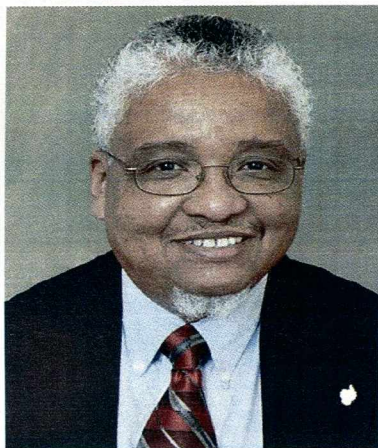


Din Istoria Sindromului Antifosfolipidic

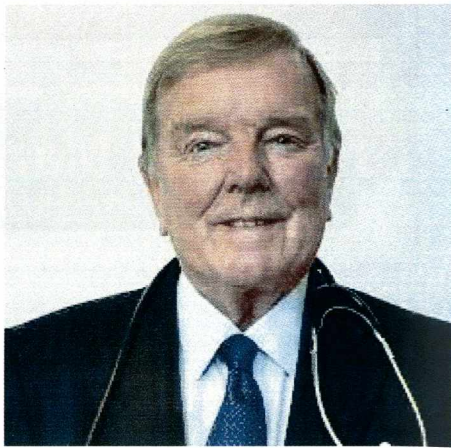
Lucia Mazur-Nicorici

1.1. DIN ISTORIA SINDROMULUI ANTIFOSFOLIPIDIC

Descifrarea sindromului antifosfolipidic a evoluat pe parcursul mai multor decenii, dar, fără îndoială, perioada de culme a acestui traseu de cunoaștere a fost deceniul cuprins între 1980 și 1990. Originile sindromului datează cu descoperirea anticoagulantului lupic de către Conley și Hartmann în 1953, cu recunoașterea asocierii dintre testul fals pozitiv biologic pentru sifilis conform testului de laborator de cercetare a bolii venerice fals pozitive [*VDRL - positive venereal disease research laboratory BFP-STs - biologically false positive serological test*] și bolile autoimune de către Moore și Mohr în anii 1950. Cercetările din următoarele două decenii au constatat că mulți pacienți cu anticoagulant lupic au prezentat frecvent BFP-STs (o parte din această istorie timpurie este reflectată în revizuirea subiectului de către E. Harris și colab. [1]).



Profesor Nigel E. Harris. Profesor emeritus, Vicecancelar al Universității din Indiile de Vest, SUA, n. 1935



Profesor Graham Hughes. Fondator și Editor al Revistei Internaționale LUPUS, n.1929, Londra, Marea Britanie

Inițial anticoagulantul lupic a fost considerat ca provocator de sângerări, dar în 1964, Walter Bowie și colab. au raportat o asocierie paradoxală a acestuia cu tromboza. Observația a fost dezvoltată de Johansson și colab. în 1974, când au detectat o asocierie între prezența lupus anticoagulantului,

testului biologic fals pozitiv serologic și tromboza produsă de pacienții cu lupus eritematos sistemic. În 1975 Nilsson și colab. au raportat o asociere alupus anticoagulantului cu moartea fetală intrauterină. Începând din 1980, interesul pentru acest subiect este în creștere, iar în perioada următoare, 1980-1983, au existat o serie de rapoarte asupra grupurilor de pacienți cu lupus anticoagulant pozitiv, tromboză venoasă sau arterială și cu pierderi recurente ale sarcinii. Un centru care a urmărit cu un interes deosebit pentru acest subiect a fost cel condus de Dr. Graham Hughes de la Spitalul Hammersmith din Marea Britanie. În 1983 Boey M. L. și colab. au raportat în British Medical Journal (BMJ) o serie de pacienți cu LES și cu lupus anticoagulant care au dezvoltat tromboze, avorturi recurente și/sau trombocitopenie [2].

Un semnal important în înțelegerea acestei tulburări a venit odată cu introducerea în 1983 a imunoanalizei în fază solidă a anti-cardiolipinei. Dr. Azuddin Gharavi, membru al grupului de la Spitalul Hammersmith, a postulat că anticorpii responsabili pentru testul lupus anticoagulant ar lega cardiolipina, fosfolipidele încărcate negativ și că o radioimunoanaliză în fază solidă ar fi un mijloc mai sensibil de detectare a acestor anticorpi.

Această ipoteză s-a bazat pe trei principii: anticoagulantul lupic s-a găsit asociat cu BFP-STS, iar anticorpii responsabili de BFP-STS s-au considerat că se leagă de cardiolipină (antigenul legat de anticorpii responsabili pentru testul VDRL în sifilis). În al doilea rând, testul de anticoagulant lupic s-a arătat „dependent de fosfolipide”, el fiind mai prelungit atunci când nivelul de fosfolipide din amestecul de testare era mai jos, și din contra – acestea deveneau negative când concentrația de fosfolipide era crescută, AL de altfel, fiind denumit „antitromboplastină” [3]. Cea de-a treia dovadă s-a bazat pe lucrarea lui Thiagarajan și colab., care au demonstrat că un anticorp monoclonal cu activitate lupus anticoagulantă este legat de fosfolipide încărcate negativ într-o placă Ouchterlony - lucrarea ulterioară a aceluiași grup (condusă de dr. Sandor Shapiro) a relatat, că la pacienții cu anticoagulant lupic anticorpii policlonali au interacționat cu fosfolipidele încărcate negativ în același sistem.

În 1983 acestui grup s-a alăturat Hughes, acesta având calitatea de cercetător cooptat de A. Gharavi pentru a testa ipoteza că depistarea anti-cardiolipinei de nivel înalt ar fi o modalitate mai sensibilă de detectare a acestor pacienți. În cursul a două luni s-a dezvoltat un prototip pentru cercetarea anticardiolipinei prin radioimunoanaliză. Din fericire, grupul Hammersmith a avut acces la serurile mai multor pacienți raportați anterior de Boey și colab., dintre care un număr semnificativ au avut

anticoagulantul lupic pozitiv. Așa cum se postulase, majoritatea pacienților cu anticoagulantul lupic pozitiv au avut și un test anti-cardiolipină cu valori pozitive. De importanță considerabilă s-a prezentat și faptul că unii pacienți cu anticoagulant lupic negativ, dar cu semne clinice de tromboză, avort recurent și/sau trombocitopenie au fost, de asemenea, pozitivi la anti-cardiolipină.

Pozitivitatea anti-cardiolipinei a fost asociată statistic cu tromboza venoasă și /sau arterială, cu trombocitopenia, a existat și o asociere vagă cu pierderea sarcinii - aceste descoperiri au fost publicate în 26 noiembrie 1983 de revista *Lancet* (acest eveniment fericit s-a datorat parțial și lui Graham Hughes, care, vizitând editorul de atunci al revistei, l-a convins pe acesta din urmă despre importanța potențială a acestei lucrări). O observație din acest studiu s-a dovedit a fi de semnificație ulterioară prin faptul că estima cum că nivelele de pozitivitate a anticorpilor anti-cardiolipinici anunță probabilitatea ca pacientul să dezvolte o tromboză sau un alt eveniment clinic asociat. Acest detaliu a ajuns să însemne că la standardizarea testului ar fi important să se elaboreze un mijloc reproductibil de măsurare a nivelului de anticorpi anticardiolipinici. La scurt timp după introducerea testului anticorpilor anti-cardiolipinici G. Hughes a sugerat, că premisele clinice ale acestei „tulburări” nu cuprind doar trombocitopenie, tromboză și pierderea sarcinii, ci și alte caracteristici precum livedo reticularis și cefaleea/migrena.

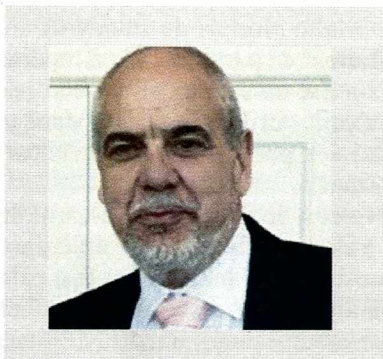
În perioada 1983 – 1987 la nivel global a crescut entuziasmul cu referire la această dereglare neobișnuită recent descoperită. În 1984 a fost organizat Simpozionul internațional consacrat anticorpilor antifosfolipidici - „Simpozionul antifosfolipidic”, eveniment care s-a derulat la Spitalul Hammersmith cu participarea profesioniștilor din domeniu care au pus în discuție acțiunile ce urmează sub acest aspect. Pe parcursul următorilor ani atenția cercetătorilor a fost concentrată mai întâi pe o mai bună înțelegere a specificității anticorpilor anticardiolipinici, apoi și pe îmbunătățirea testului în sine. Astfel s-a constatat că anticorpii anticardiolipinici ar putea fi „absorbiți” prin adăugarea în ser a lipozomilor fosfolipidici încărcati negativ, apoi s-a demonstrat că acești anticorpi au legat plăcile acoperite cu fosfolipide încărcate negativ (cum ar fi fosfatidilserina și acidul fosfatidic), precum și plăcile acoperite cu cardiolipină.

Ultimele observații au determinat investigatorii să concluzioneze că anticorpii „anticardiolipinici” ar fi mai bine denumiți „anticorpi antifosfolipidici”, deoarece anticorpii par să se lege la fel de bine de fosfolipidele încărcate negativ. Ulterior a fost extins termenul pentru a include lupus anticoagulantul, care, din motivele menționate anterior, se

credea că are o specificitate similară. Până în 1986, aceștia nu erau referiți la anticorpi „anticardiolipinici”, iar pentru ei s-a folosit termenul „antifosfolipidă”. Precum s-a menționat, eforturile s-au concentrat pe îmbunătățirea tehnicii de testare. Unii investigatori au observat că utilizarea serului de vițel fetal sau a serului de la bovine adulte ca diluanți în testul pentru anticardiolipină a crescut semnificativ semnalul pozitiv, iar testul s-a dovedit mai stabil și reproductibil.



Profesor Ricard Cervera, n. 1961, Profesor la Universitatea Catalonia, Șeful Departamentului Boli autoimune Barcelona, Spania; Co-fondator Academia Lupus Coordonator Grupul Euro-Lupus (1991–2008) Proiectul Euro Fosfolipid (2009–2017)



Profesor Munther Khamashta, n. 1953, profesor consultant King's College Londra, Marea Britanie; Co-fondator Academia Lupus Proiectul Euro Fosfolipid (2009–2017)

Abia în 1990 s-a recunoscut că proteina serică beta-2-glicoproteina 1 este un antigen important prezent în serul de vițel fetal sau de bovină adultă, utilizat ca și diluant, și acest lucru a explicat rezultatele cercetărilor notate. În primii doi ani de la introducerea testului și adoptarea acestuia de către laboratoarele din întreaga lume a crescut îngrijorarea pentru faptul că metodele utilizate la detectarea anticorpilor anti-cardiolipinici variază considerabil între laboratoare, astfel că unele observații raportate în literatură ar putea fi suspecte. În 1986 acest lucru

a determinat cercetătorii britanici să organizeze un atelier internațional pentru standardizarea testului anticorpilor anti-cardiolipinici (rezultatele atelierului au fost raportate la al doilea simpozion antifosfolipidic organizat la Spitalul St. Thomas din Londra, Marea Britanie), modul în care a fost organizat atelierul fiind nou la timpul său. Teza centrală a atelierului a fost condiția ca laboratoarele care efectuează testul de anticorpi anti-cardiolipinici să uzeze un test valid, care să poată măsura în mod reproductibil nivelele de anticorpi. Spre deosebire de majoritatea celorlalte eforturi de standardizare a testelor cu autoanticorpi, nu ar fi suficient ca participanții să raporteze un rezultat pozitiv sau negativ, dar li s-a dat un set de calibrare și rezultatele lor trebuiau să se coreleze cu „valorile atribuite” acelor standarde, fiind preparate prin amestecarea unui ser pozitiv (cu nivel ridicat) cu cantități crescende de ser uman normal.

Nivelul de anticorpi anti-cardiolipinici din serul cu nivel crescut a avut o valoare atribuită în unitățile adoptate, iar nivelele din celelalte amestecuri (standarde) au fost calculate pe baza proporției de ser pozitiv din amestec. Aceste nivele au fost raportate în unități GPL (pentru IgG anti-cardiolipină), unități MPL (pentru IgM anti-cardiolipină) și ulterior – în unități IgA (pentru IgA anti-cardiolipină), care au fost adoptate la scară largă.

Am argumentat astfel că o analiză validă ar fi una care arăta o „bună corelație statistică” între valoarea calculată a standardului și valorile densității optice obținute în analiza efectuată de laboratorul respectiv. Această abordare a fost în măsură să determine ce laboratoare au avut teste valide și care au fost caracteristicile tehnice ale testului ce a permis utilizarea serului de bovine ca diluant al probelor de la pacienți, ceea ce s-a dovedit a fi o caracteristică foarte importantă.

Până la mijlocul anilor 1980 se considera că această tulburare nu era un subset al LES, ci o entitate separată (într-o serie de rapoarte anterioare, în special din grupurile de hematologie, mulți pacienți afectați nu aveau neapărat LES). A fost făcută o propunere inițială de numire a tulburării „sindromul anti-cardiolipinic”, însă, având în vedere dovezile că anticorpii aparțineau unei familii mai mari de „anticorpi antifosfolipidici”, a fost introdus termenul „Sindromul antifosfolipidic”. În 1987, într-un editorial publicat în Revista Britanică de Reumatologie (British Journal of Rheumatology) au fost sugerate criteriile pentru clasificarea acestui „Sindrom” (editorialul era intitulat „Sindromul Lebedei Negre”). Pacienții au fost definiți ca având Sindromul

Antifosfolipidic dacă prezintă cel puțin una dintre următoarele caracteristici clinice - tromboză venoasă sau arterială, pierderea recurentă a sarcinii și/sau trombocitopenie - și cel puțin un test de laborator - anticoagulantul lupus sau un test de anticorpi anticardiolipină pozitiv cu valori medii până la înalte. Testul de laborator a trebuit să rămână pozitiv, cel puțin, cu două ocazii, la opt săptămâni distanță. Acest lucru s-a făcut pentru a distinge tulburarea inedită de cea din bolile infecțioase, în care testele anticoagulante sunt „fals pozitive” sau când, mai puțin frecvent, lupus anticoagulantul se afișează în mod tranzitoriu.

Mai târziu, a fost propus ca Sindromul antifosfolipidic (SAFL) să fie subclasificat în categorii „primare” și „secundare” - pe baza absenței sau, respectiv, a prezenței LES. Și asta cu toate că autorii au găsit puține beneficii în această subclasificare, deoarece în majoritatea cazurilor nu pare să existe vreo diferență în manifestările clinice sau de laborator, prognosticul și managementul necesar. O concluzie similară a fost făcută două decenii mai târziu de către membrii unui atelier de revizuire a criteriilor pentru SAFL.

În anii următori au existat două ateliere oficiale de experți pentru stabilirea și revizuirea criteriilor pentru SALF (la simpozionul antifosfolipidic de la sfârșitul anilor 1990, la Sapporo [4] și apoi la conferința de la Sydney [5]). În principal, mai multe dintre caracteristicile esențiale ale primelor criterii propuse au predominat, dar mult mai mult prin definițiile a ceea ce ar constitui caracteristicile clinice, de laborator. Suplimentarea testului anti-beta-2-glicoproteină I permite acum o clasificare mai fiabilă pentru studiile clinice. Recunoașterea unui mic subgrup de pacienți ce prezintă o formă agresivă de tromboză cu multiple locații s-a produs la începutul anilor '90. Numele de coagulopatie (vasculopatie) diseminată acută a fost propus pentru prima dată de E. Harris într-un editorial, dar acest lucru a dat loc nomenclaturii mai ușor de utilizat - „Sindromul antifosfolipidic catastrofic”, propus de Ronald Asherson. Colectarea unor serii de pacienți și o mai bună înțelegere a tulburării este atribuită lucrărilor ulterioare aparținând lui R. Asherson, Ricard Cervera și colab.



Profesor Ronald Asherson (1934-2008) autoritate de renume mondial în SAFL, autorul conceptului de SAFL primar (1988) și SAFL catastrofic – 1992



Profesor Spiros Miyakis, n. 1952, autorul Criteriilor de clasificare a SAFL, Sydney, 2006, Universitatea Wollongong Wales, Australia

În anii 1990 și după 2000 cercetările au continuat în laboratorul condus de E. Nigel Harris și dr. Silvia Pierangeli. Interesul grupului de investigatori a fost standardizarea testului anticardiolipinic. A fost dezvoltată o variantă a testului care utilizează un amestec propriu de fosfolipide (Testul ELISA- Louville APHL), distribuit comercial sub formă de kit. Acest test special permite reducerea substanțială a rezultatelor „fals pozitive” posibile în testul anticardiolipinei. S-a continuat prin maximizarea performanței acestui test, iar derivații standard dezvoltați în anii 1980 sunt încă distribuiți de Laboratorul de standardizare a antifosfolipidelor. Prin activitatea de cercetare din ultimii 20 de ani grupul denumit a dezvoltat un model de tromboză la șoareci cu SAFL și a realizat mai multe studii (publicate la scară largă) despre rolul anticorpilor antifosfolipidici în tromboză. Astfel s-a evoluat spre a lucra asupra mecanismelor trombozei la nivel molecular, utilizând atât modelul de șoarece, cât și studiile *in vitro* [6].

Proiectul Euro-fosfolipid a început în 1999 cu un design multicentric, consecutiv și prospectiv. A fost urmărită o cohortă totală de 1000 de pacienți cu sindrom antifosfolipidic (SAFL), derivată din 13 țări (Belgia, Bulgaria, Danemarca, Franța, Germania, Grecia, Ungaria, Israel, Italia, Țările de Jos,

Portugalia, Spania și Regatul Unit). Acest proiect a permis identificarea prevalenței și caracteristicilor principalelor manifestări clinice și imunologice la debutul și în timpul evoluției SAFL și a demonstrat că este posibil să se recunoască subgrupuri mai omogene de semnificație clinică. Pacienții cu SAFL asociat cu lupus eritematos sistemic (LES) au prezentat mai multe episoade de artrită, livedo reticularis și mai frecvent aveau trombocitopenie și leucopenie. Pacientele de sex feminin au dezvoltat mai multe episoade de artrită și livedo reticularis - ambele legate de prevalența mai mare a migrenei și a SAFL relaționat cu LES la femei, în timp ce pacienții de sex masculin au dezvoltat mai multe incidente de infarct miocardic, epilepsie și tromboză arterială a membrelor inferioare. Pacienții cu debutul SAFL în copilărie au prezentat mai multe episoade de coree și tromboză venoasă jugulară, în timp ce pacienții cu debut la vârstă înaintată au fost mai frecvent de sex masculin și au suportat mai multe accidente vasculare cerebrale și angină pectorală, dar la aceștia era mai puțin frecvent livedo reticularis [7].

Obiectivul studiului "Sindromul antifosfolipidic la pacienții din America Latină: caracteristici clinice și imunologice comparate cu cele ale pacienților europeni" a fost cel de a analiza prevalența și caracteristicile principalelor manifestări clinice și imunologice la debutul și pe parcursul evolutiv al bolii într-o cohortă de pacienți din America Latină (în principal de origine metisă) și de a compara pacienții din America Latină cu cei europeni. Caracteristicile clinice și serologice a 100 de pacienți cu SAFL din Mexic și Ecuador au fost colectate într-o formă de protocol identică cu cea utilizată pentru studierea coortei Europene. Cohorta a fost formată din 93 de pacienți de sex feminin (93,0%) și șapte (7,0%) pacienți de sex masculin. Au fost 91 de metiși (91,0%), șapte albi (7,0%) și doi amerindieni (2,0%). Cele mai frecvente manifestări au fost livedo reticularis (40,0%), migrena (35,0%), tromboza venoasă profundă a extremității inferioare (32,0%), trombocitopenia (28,0%) și anemia hemolitică (20,0%). Manifestările clinice mai răspândite la pacienții din America Latină decât la pacienții europeni au inclus în principal fenomene neurologice (migrenă, amnezie globală tranzitorie, encefalopatie ischemică acută, amauroză fugace) și cutanate (livedo reticularis, ulceratii ale pielii, necroză cutanată superficială, hemoragii multiple subunghiale), precum și anemie hemolitică. Sindromul antifosfolipidic are o mare varietate de manifestări clinice și imunologice la debutul și pe parcursul evoluției bolii, pe lângă factorii de mediu, cei ai originii etnice și condițiile socio-economice, care de asemenea pot modifica expresia bolii [8].

Forumul european privind anticorpii antifosfolipidici oferă o rețea multidisciplinară de experți diferiți, cu un interes comun în anticorpii antifosfolipidici și sindromul antifosfolipidic. Zece întâlniri de succes au fost organizate din 1997 în diferite orașe (Paris, Veneția, Utrecht, Londra, Barcelona, Ljubljana, Marsilia, Padova, Cracovia și Nancy), oferind o oportunitate excelentă pentru clinicienii și oamenii de știință europeni implicați în domeniul SAFL de a se întâlni și consolida colaborări curente și viitoare. Actualizarea studiului RISAPS a fost prezentată de Dr. Cohen H. (Londra, Marea Britanie) - un studiu randomizat controlat de fază 2/3 de non-inferioritate care a testat rivaroxabanul (15 mg de două ori pe zi) versus warfarină (țintă INR 3,5) la 140 de pacienți cu AVC. Rezultatul primar (de exemplu, rata de schimbare a hiperdensității substanței albe cerebrale între momentul inițial și urmărirea după 24 de luni), precum și rezultatele secundare cheie (de exemplu, markerii neuroradiologici, evenimentele clinice) vor fi comparate. Valoarea diagnosticului biomarkerilor noi pentru predicția complicațiilor clinice la pacienții asimptomatici cu APL a fost evaluată de A. Hoxha (Padova, Italia). IgA anti- β 2GPI s-a dovedit a fi un factor de risc independent pentru dezvoltarea evenimentelor trombotice la subiecții asimptomatici. În plus, anticorpii IgD aDI și aPS/PT au fost factori de risc independenți pentru dezvoltarea evenimentelor trombotice la purtătorii aPL. Detectarea anticorpilor IgA-a β 2GPI, aDI și aPS/PT poate fi, prin urmare, utilizată pentru evaluarea riscului împreună cu testele convenționale [9].

O echipă de cercetători afiliați la mai multe instituții din Germania și SUA au găsit o țintă de suprafață celulară pentru autoanticorpii care vizează fosfolipidele ce contribuie la sindromul antifosfolipidic (SAFL). În lucrarea publicată în revista Science grupul descrie modul în care au folosit modele de șoarece cu SAFL, cu pierdere fetală indusă de fosfolipide și tromboză pentru a studia legătura dintre factorii care contribuie la dezvoltarea sindromului antifosfolipidic. Prin studierea receptorului proteinei C endoteliale (*endothelial protein C receptor - EPCR*) și a modului în care acesta interacționează cu acidul lizobisfosfatidic (LBPA), cercetătorii au reușit să identifice țintele pentru antifosfolipide (antiphospholipide-aPL) de la suprafața celulei și să vadă cum a fost mediat intern. Mai exact, s-a descoperit că EPCR a servit ca receptor de suprafață celulară pentru antifosfolipide. De asemenea, s-a constatat că EPCR a mediat internalizarea antifosfolipidelor în anumite circumstanțe și că legarea antifosfolipidelor la EPCR-LBPA a dus la activarea coagulării și la producerea de interferon- α în celulele dendritice, ceea ce a indus crearea mai multor celule B1a, care sunt producătoare de antifosfolipide [10].

1. Harris E. et al. Lupus anticoagulant. *Clinics in Rheumatic Diseases*, 1985; 11:591-609.
2. Boey M L, Colaco C B, Gharavi A E, Elkon K B, Loizou S, Hughes G R. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1983 Oct 8; 287(6398):1021-3. doi: 10.1136/bmj.287.6398.1021.
3. Harris E N, Gharavi A E, Hughes G R et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983 Nov 26; 2(8361):1211-4. doi: 10.1016/s0140-6736(83)91267-1269.
4. Lockshin MD, Sammaritano L R, Schwartzman S. Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome *Arthritis Rheum.* 2000 Feb; 43(2):440-443. doi: 10.1002/1529-0131(200002)43:2<440::AID-ANR26>3.0.CO;2-N.P]
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306].
6. Harris E. Nigél. History of the Antiphospholipid Syndrome 2009 <http://www.scielo.org.co>].
7. Cervera R, Boffa M-C, Khamashta M A, Hughes G R V. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus*. 2009 Sep; 18(10):889-93. doi: 10.1177/0961203309106832).
8. García-Carrasco M, Galarza C, Gómez-Ponce M, Cervera R, et al. Antiphospholipid syndrome in Latin American patients: clinical and immunologic characteristics and comparison with European patients. *Lupus*. 2007; 16(5):366-73. doi: 10.1177/0961203307077108).
9. Tektonidou M, Andreoli L, Limper M et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults <http://orcid.org/0000-0003-2238-0975>, <http://orcid.org/0000-0002-9107-3218>, <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215213>.
10. Müller-Calleja et al. Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity *Nadine, Science*, 2021. <https://medicalxpress.com/news/2021-03-antiphospholipid-syndrome-breakthrough-cell-surface-path.html> , DOI: 10.1126/science.abc0956)