



Sindromul antifosfolipidic seronegativ

Snejana Vetrilă

2.5. SINDROMUL ANTIFOSFOLIPIDIC SERONEGATIV

Sindromul antifosfolipidic (SAFL) se caracterizează prin tromboză arterială și/sau venoasă difuză, pierderea recurentă a sarcinii și anticorpi antifosfolipidici persistent pozitivi [1]. Ultimele criterii de clasificare pentru diagnosticul SAFL sunt criteriile Sapporo, revizuite în 2006, care invocă prezența a cel puțin unei manifestări clinice și a unui criteriu pozitiv de laborator [1]. Aplicarea în practica medicală a criteriilor Sapporo au relevat o serie de controverse, deoarece acestea s-au autentificat doar la un grup omogen de pacienți cu SAFL în detrimentul altui grup, denumit SAFL seronegativ (SAFL-SN).

Termenul de *sindrom antifosfolipidic seronegativ (SAFL-SN)* a fost introdus pentru prima dată în anul 2003 de către Hughes și Khamashta pentru a descrie pacienții cu manifestări clinice extrem de sugestive pentru SAFL, dar cu anticorpi antifosfolipidici persistent negativi pentru lupus anticoagulant (LA), anti-cardiolipină (aCL) și anti-β2 glicoproteina I (anti-β2GPI) [2]. Asemenea SAFL clasic, SAFL-SN poate urma o evoluție accelerată, generând leziuni în mai multor organe și devenind o afecțiune medicală care poate pune viața în pericol - boală cunoscută sub denumirea de SAFL catastrofic [3,4].

Astfel, a fost propus termenul de SAFL-SN pentru pacienții cu semne clinice sugestive pentru SAFL, dar persistent negativi pentru detectarea anticorpilor utilizați de rutina, precum aCL, aβ 2-GPI și LA.

Diagnostic pozitiv

Caracteristicile clinice ale SAFL-SN par a fi similare cu SAFL clasic, iar cea mai convingătoare explicație pentru existența unor astfel de pacienți „seronegativi” poate fi aceea că gama actuală de teste accesibile este insuficientă. Deoarece pacienții testați negativ în mod persistent pentru SAFL nu pot fi confirmați cu SAFL conform criteriilor, dar care au caracteristici clinice foarte sugestive, mai multe studii la acest subiect s-au concentrat pe anticorpii cu potențial alternativ pentru diagnosticarea de laborator a acestui sindrom.

Multiplele dovezi susțin o relație certă între manifestările clinice ale SAFL și anticorpii împotriva unei *fosfolipide zwitterionice*, denumiți și anticorpi **anti-fosfatidiletanolamină - antibodies to phosphatidylethanolamine (aPE)** [5]. Este cunoscut, că PE acționează

ca un anticoagulant, îmbunătățind activitatea proteinei C activă în reacțiile de coagulare a sângelui. Alternativ, Tsuda și colab. au constatat că efectul anticoagulant al PE se realizează prin inhibarea sistemului factorului Xa – protrombină (PT) [6].

S-a mai raportat că aPE sunt semnificativ asociați cu evenimente clinice majore, precum pierderea fetală și/sau tromboza și că sunt prezenți în principal în absența criteriilor de laborator ale SAFL. O serie de articole au relatat despre semnificația clinică a aPE, în multe cazuri aceștia fiind unicii indicatori la pacienții cu simptome sugestive de SAFL.

În ceea ce privește complicațiile obstetricale, într-un studiu de caz-control ce a încadrat 1554 de femei, despre care nu se știa că au boli autoimune anterioare, s-a constatat că IgM - aPE este mult mai frecventă la femeile cu avort spontan inexplicabil comparativ cu grupul de femei sănătoase.

Au fost publicate articole care au studiat relația dintre aPE și tromboză, o altă caracteristică clinică cheie a SAFL. Astfel într-un raport despre anti-PE acesta a fost singurul anticorp antifosfolipidic detectat la 6 din 34 de pacienți cu tromboze și anticorpi LA negativi [7]. Ulterior dr. Hirmerova a estimat criteriile și non-criteriile de aPL la 140 de pacienți cu tromboză venoasă și 136 de martori, în încercarea de a defini profilul aPL la pacienții trombotici. Dintre diferitele criterii non-criteriale testate, doar IgM-aPE a fost semnificativ mai relevantă la pacienții cu tromboză venoasă decât la martori (14,3%; $p = 0,035$). De consemnat că IgM-aPE a fost prezentă în majoritatea cazurilor fără criterii aFL [8].

Din rezultatele studiilor raportate rezidă că aPE sunt promițători pentru diagnosticul pacienților seronegativi cu SAFL, deși este necesară o ELISA standardizată și validă pentru detectare.

Panoul de antifosfolipide explorat pentru identificarea precoce a SAFL-SN a fost extins prin cercetarea anticorpilor împotriva acidului fosfatidic (PA): *fosfatidilserină (PS)* și *fosfatidilinozitol (PI)*, care se încadrează în categoria fosfolipidelor anionice. Acestea se găsesc, în proporții variabile, pe membranele interioare și exterioare ale aproape fiecărei celule. Cu toate acestea, încadrarea acestui grup de anticorpi în diagnosticul SAFL este încă controversată [9]. Pe baza dovezilor

actuale, al 13-lea Congres internațional privind anticorpii antifosfolipidici nu a recomandat testarea aPA, aPS și aPI, deoarece acești anticorpi păreau să se suprapună cu markerii diagnostici acceptați în SAFL. Totuși, a fost încurajată dezvoltarea unei metode standardizate pentru testarea aPS, care s-a dovedit a fi cea mai promițătoare dintre celelalte fosfolipide anionice, în special la femeile cu anamnezic de avort spontan [9].

Anticorpii IgG și IgM anti-β2GPI au fost suplimentați la criteriile Sapporo modificate [1,10]. În populația eterogenă de aPLs, β2GPI este considerată a fi cel mai important antigen din SAFL [11]. Anticorpii anti-β2GPI cuprind, de asemenea, o familie diversă de anticorpi care recunosc epitopi diferiți pe β2GPI. În ultimul deceniu, datele acumulate au arătat că domeniul I, din cele cinci domenii omoloage ale β2GPI, este epitopul primar pentru aPLs. Reactivitatea la domeniul I, în special glicină40-arginină43, a fost prezentată pentru prima dată de Iverson și colab. [12].

β2GPI este o glicoproteină sintetizată în principal de hepatocite, dar este prezentă în concentrații mari în plasmă. ARNm β2GPI este detectat și în astrocitele fetale, neuroni, limfocite, celule intestinale, placentare și endoteliale. Prin citometrie în flux s-a constatat că β2GPI este exprimat pe suprafața celulară a monocitelor din sângele periferic uman. Unele dintre funcțiile β2GPI sunt inhibarea protrombinazei și tenazei și activarea factorului XII și XI, în rolul său de reglator natural anticoagulant.

În încercarea de a demonstra semnificația clinică a **anticorpilor anti-domeniul I de β2GPI** la pacienții cu SAFL, în studii s-a dovedit că ei ar fi asociați cu tromboza (predominant venoasă) mai mult decât omologii lor vizați către alte domenii ale β2GPI [13]. Cu toate acestea, sunt necesare studii clinice prospective suplimentare și date *in vivo* privind cauzalitatea anti-domeniului I în SAFL, împreună cu un protocol de consens standardizat pentru testul anti-domeniul I, înainte ca acest anticorp să poată fi adăugat la criteriile diagnostice certificate.

Anticorpi la complexul vimentină/cardiolipină

Vimentina este cel mai abundent filament intermediar de tip III al sistemului citoscheletal. Vimentina a fost recent interceptată pe

suprafața neutrofilelor apoptotice și pe celulele T macrofage activate, pe trombocite, celulele endoteliale vasculare și altele.

În căutarea de noi ținte antigenice pentru diagnosticarea SAFL, o abordare proteomică a identificat vimentina drept principala moleculă endotelială recunoscută de antifosfolipide. Această descoperire a fost urmată de o cercetare *in vitro*, în care la subiecți cu anticardiolipina negativă s-a constatat anti-vimentina pozitivă. Rezultatele au semnalat prezența persistentă a anticorpilor anti-vimentină/complex cardiolipină IgG și IgM la majoritatea pacienților cu SAFL și la o mare parte din pacienții diagnosticați cu SAFL-SN [14].

Detectarea anticorpilor antiprotrombinici (aPT) variază foarte mult de la un kit ELISA la altul. Protrombina este o glicoproteină plasmatică transformată în trombină prin tromboplastina extrinsecă în timpul celei de-a doua etape a coagulării sângelui. aPT au fost recunoscuți pentru prima dată în 1995, dar din diferite studii, în principal retrospective, s-au obținut concluzii contradictorii privind semnificația lor clinică. Cu toate acestea, în ultimii ani, cel puțin două studii prospective au validat rolul aPT în predicția riscului de tromboză la pacienții cu SAFL [15].

Anticorpii antiprotrombinici aPT, de asemenea, sunt capabili să se lege de complexul PT/PS, dând naștere unui nou grup de anticorpi implicați în manifestările clinice legate de SAFL. Bertolaccini et al. au demonstrat asocierea pozitivă între **aPS/PT (izotip IgG și/ sau IgM)** și tromboza arterială și/ sau venoasă. Mai mult, aPS / PT are sensibilitate și specificitate mai mare decât aCL și, având în vedere corelația sa solidă cu LA, poate fi utilizat ca test de confirmare pentru SAFL [16].

Pe baza studiilor descrise aPT și aPS / PT se arată a fi anticorpi promițători, care pot fi potențial utilizați ca marcheri diagnostici de confirmare și ca indicatori ai riscului de tromboză. Cu toate acestea, trebuie întreprinse studii de colaborare suplimentare și eforturi mai conjugate de standardizare pentru a include acești anticorpi în criteriile de diagnostic al SAFL.

În revizuirea anticorpilor implicați în SAFL-SN se regăsește și **anexina A5 și anticorpul anexinei A5 (aAnx A5)**. Anexina A5 este o proteină anticoagulantă care se găsește în principal în trofoblaste și endoteliocitele vasculare. După legarea de fosfolipidele anionice, aceasta oligomerizează pentru a forma un scut protector împotriva enzimelor de coagulare. Pacienții cu timp de coagulare mai mic decât cel de referință sunt considerați rezistenți la anexina A5. Pentru a-și verifica propriile concluzii, Rand a colectat date din cinci studii și a

depistat că 52% dintre pacienții cu SAFL conform criteriilor actuale de consens au fost găsiți rezistenți la anexina A5, în comparație cu 2-5% din cei fără boală (control) și SAFL-SN.

În consecință, grupul de lucru al celui de-al 13-lea Congres internațional privind anticorpii antifosfolipidici a solicitat date clinice suplimentare și a încurajat alte centre să implementeze testul de rezistență la Anexina A5 înainte de a-l recomanda ca parte a panelului standard de testare antifosfolipidică [9].

După cum s-a menționat anterior, diagnosticul SAFL necesită prezența a cel puțin unui anticorp pozitiv - IgG sau IgM pentru aCL, LA sau anticorpi anti- β 2GPI. Numeroase studii au examinat rolul izotipurilor IgA pentru testele menționate anterior. Este bine cunoscut faptul că distribuția izotipului aCL este relativ dependentă de etnie și *IgA aCL* nu face excepție. Prevalența IgA aCL în LES a fost demonstrată la afro-americani, afro-caraibieni și hispanici ca fiind de 16, 21 și, respectiv, 14% [17].

De asemenea, un studiu a arătat o relație pozitivă între nivelele crescute de IgA aCL și trombocitopenia semnalată la pacienții cu LES sau alte boli vasculare de collagen [96]. Având în vedere aceste studii, se recomandă verificarea testului IgA aCL în cazurile de suspiciune clinică crescută pentru SAFL cu IgG și IgM aCL negative [9].

IgA anti- β 2GPI a fost găsită în diferite studii ca fiind un marker independent pentru dezvoltarea diferitelor manifestări ale bolii aterosclerotice, cum ar fi infarctul miocardic acut și ischemia cerebrală acută. De asemenea, diferite studii au descris asocierea dintre expresia exclusivă a anticorpului IgA anti- β 2GPI și manifestările clinice ale SAFL. De exemplu, femeile cu avorturi spontane recurente inexplicabile și moarte fetală au exprimat doar izotipul IgA de anticorp anti- β 2GPI, LA fiind negativ [18].

Mehrani a prezentat, de asemenea, date care confirmă asocierea dintre anticorpii IgA anti- β 2GPI și tromboză la pacienții cu LES. Mai mult, Mehrani a demonstrat că anticorpul IgA anti- β 2GPI este mai implicat în tromboza venoasă profundă decât izotipul IgM.

Studiile recente publicate recomandă ca pacienții să fie testați pentru anticorpii IgA anti- β 2GPI în prezența simptomelor de LES și/sau SAFL, mai ales atunci când alte teste aPL sunt negative. Cu toate acestea, pentru a fi inclus în criteriile de clasificare aprobate pentru APS, sunt necesare mai multe studii.

Tabelul 1. Recomandări privind SAFL fără criterii

Anticorpul fără criterii	Recomandări
Anticorpi anti-PE	Aveți nevoie de ELISA aPE standardizată, pe lângă studii clinice bine concepute, pentru a confirma valoarea diagnostică a acestui test.
Anticorpi pentru fosfolipide încărcate negativ, altele decât cardiolipina: PA, PS și PI	Rămâne a fi stabilit dacă acești anticorpi recunosc pacienți suplimentari cu SAFL. Sunt necesare studii clinice suplimentare pentru a susține și justifica modificarea criteriilor Sapporo.
Anticorpi anti-domeniul I ai β2GPI	Anti-PS pare a fi cel mai promițător și relevant în domeniul RPL. Datele clinice sunt încurajatoare, cu toate acestea, sunt necesare studii clinice prospective suplimentare și date <i>in vivo</i> despre cauzalitatea anti-domeniului I în SAFL.
Anticorpi pentru complexul vimentină/cardiolină	Persistent pozitiv la aproape toți pacienții cu APS și la un număr mare de pacienți SNAPS. Prezența lor se suprapune la pacienții cu LES și AR, ceea ce face ca specificitatea lor ca marker de diagnostic să fie în mare măsură echivocă.
Anti-PT: aPT-A și a FS-PT	Teste specifice bune pentru confirmarea SAFL, dar standardizarea trebuia inclusă în criteriile de diagnostic. Anti-PT-A + alte teste: marker de risc bun pentru tromboză. Asocierile lor clinice trebuie confirmate prin studii colaborative.
Testul de rezistență la anexina A5	Există date promițătoare cu privire la utilizarea lor ca marker mecanic de diagnostic pentru SAFL, dar se cer date suplimentare înainte de includerea acestora în panourile de testare aPL.
Anticorpi anti-β2GPI IgA aCL și IgA	Testarea pentru IgA aCL și testul anti-β2GPI este recomandată în cazurile cu suspiciune clinică ridicată pentru APS, cu anticorpi IgG negativi și IgM aCL. Valoarea de diagnostic a pozitivității anti-β2GPI izolate trebuie evaluată prin mai multe teste APL disponibile la nivel comercial, pe o populație de pacienți mai mare și bine caracterizată.

În concluzie, SN-APS reprezintă un mozaic, unde se pot evidenția anticorpi împotriva diferitor ținte antigenice. Studiile au raportat implicarea mai multor alți antigeni, în afară de cei menționați în criteriile Sapporo, variind de la fosfolipide anionice până la complexe fosfolipide proteice și proteine plasmatică. În studii au fost evaluați cei mai relevanți anticorpi care urmează în curând să fie introduși pe urmele anticorpului anti- β 2GPI în criteriile Sapporo revizuite ca unul dintre markerii de diagnostic de laborator al SAFL, împreună cu LA și aCL (tabelul 1).

Cercetările actuale sunt orientate spre creșterea randamentului de diagnostic în SAFL, în special la pacienții care prezintă manifestări clinice, dar persistent negativi pentru markerii de laborator acceptați, și anume la anticorpii aCL, LA și α 2GPI. În continuă expansiune, dovezile științifice au demonstrat o prevalență tot mai mare a anticorpilor față de alți antigeni în SAFL clinic manifest. În această familie eterogenă de anticorpi aPL cea mai perspicace se consideră anticorpii anti PE, proteinele plasmatică care leagă fosfolipidele (PT, proteina C, proteina S, anexina V și domeniile β 2GPI), complexe de fosfolipide-proteine (complexul vimentină/cardiolipină) și fosfolipidele anionice, altele decât cardiolipina (PS, PI și PA) [19]. Deși aceste molecule pot permite detectarea precoce a SAFL, relevanța lor clinică este încă discutabilă și trebuie confirmată prin eforturi internaționale pentru standardizarea instrumentelor de diagnostic și aplicarea lor în studii longitudinale pe un număr mult mai mare de pacienți.

Indice bibliografic

1. 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, vol. 4 (pg. 295-306)
2. Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome, *Ann Rheum Dis*, 2003, vol. 62 pg. 1127
3. Lazurova I, Macejova Z, Tomkova Z, et al. Severe limb necrosis: primary thrombotic microangiopathy or 'seronegative' catastrophic antiphospholipid syndrome? A diagnostic dilemma, *Clin Rheumatol*, 2007, vol. 26 (pg. 1737-40)
4. Sanmarco M. Clinical significance of antiphosphatidylethanolamine antibodies in the so-called 'seronegative antiphospholipid syndrome', *Autoimmun Rev*, 2009, vol. 9 (pg. 90-2)
5. McIntyre JA, Wagenknecht DR. Anti-phosphatidylethanolamine (aPE) antibodies: a survey, *J Autoimmun*, 2000 (pg. 185-93)
6. Tsuda T, Yoshimura H, Hamasaki N. Effect of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylcholine on the activated factor X-prothrombin system, *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2006, vol. 17 (pg. 465-9)
7. Berard M, Chantome R, Marcelli A, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies. I. Association with thrombosis and vascular cutaneous diseases, *J Rheumatol*, 1996, vol. 23 (pg. 1369-74)
8. Hirmerova J, Ulcova-Gallova Z, Seidlerova J, et al. Laboratory evaluation of antiphospholipid antibodies in patients with venous thromboembolism, *Clin Appl Thromb Hemost*, 2010, vol. 16 (pg. 318-25)
9. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010, *Lupus*, 2011, vol. 20 (pg. 191-205)
10. Wilson WA, Gharavi AE, Piette JC. International classification criteria for antiphospholipid syndrome: synopsis of a post-conference workshop held at the Ninth International (Tours) aPL Symposium,

Lupus, 2001, vol. 10 (pg. 457-60)

11. De Laat B, Derksen RH, van Lummel M, et al. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change, *Blood*, 2006, vol. 107 (pg. 1916-24)

12. Iverson GM, Reddel S, Victoria EJ, et al. Use of single point mutations in domain I of beta 2-glycoprotein I to determine fine antigenic specificity of antiphospholipid autoantibodies, *J Immunol*, 2002, vol. 169 (pg. 7097-103)

13. De Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, et al. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis, *Blood*, 2005, vol. 105 (pg. 1540-5)

14. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, et al. Vimentin/cardioliipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome, *Blood*, 2010, vol. 116 (pg. 2960-7)

15. Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, et al. A prospective study of antibodies to beta2-glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis, *J Thromb Haemost*, 2005, vol. 3: 1231-1238

16. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant, *Arthritis Rheum*, 2000, vol. 43 (pg. 1982-93)

17. Pierangeli SS, Liu XW, Barker JH, et al. Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome, *Thromb Haemost*, 1995, vol. 74 (pg. 1361-7)

18. Danowski A, Kickler TS, Petri M. Anti-beta2-glycoprotein I: prevalence, clinical correlations, and importance of persistent positivity in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol*, 2006, vol. 33 (pg. 1775-9)

19. Rabih Nayfe, Imad Uthman, Jessica Aoun, Ehab Saad Aldin, Mira Merashli, Munther A. Khamashta. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology*, Volume 52, Issue 8, August 2013, Pages 1358-1367