



FACULTAD DE MEDICINA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO.
NUEVOS AUTOANTICUERPOS**
.....
**ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME.
NEW AUTOANTIBODIES**

Autor: Esther Fernández Fonseca

Director: Víctor Manuel Martínez Taboada

Codirector: Marcos López Hoyos

Santander, Junio de 2017

Índice

Resumen.....	3
Fundamento.....	5
Objetivos	14
Material y métodos.....	14
Pacientes	14
ELISA.....	15
Procedimiento de Ensayo.....	16
Interpretación de los resultados	16
Análisis estadístico	17
Resultados.....	17
Discusión	27
Conclusiones	31
Agradecimientos	31
Bibliografía	32
Anexo I - Criterios diagnósticos del síndrome antifosfolípido	34
Anexo II. Resumen de los hallazgos publicados sobre la prevalencia de los nuevos autoanticuerpos.....	35

Resumen

El diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF) requiere tanto de evidencia clínica, como de la presencia confirmada de anticuerpos antifosfolípidos en ensayos repetidos (Criterios de Sydney 2006). Sin embargo, en los últimos años debido a la aparición de los SAF seronegativos (pacientes con un perfil clínico sugestivo de SAF pero que persistentemente son negativos para los aPL de uso rutinario), se hizo necesario buscar nuevas dianas antigénicas.

Objetivos:

- Determinar la frecuencia de los nuevos autoanticuerpos en los diferentes grupos de estudio.
- Determinar la asociación de los nuevos autoanticuerpos con las manifestaciones clínicas de la enfermedad y describir si aportan un valor adicional a la caracterización del SAF.
- Valorar el impacto del uso de los anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protombina (PS/PT), en lugar del anticoagulante lúpico (AL), como sustituto en el seguimiento de los pacientes SAF en tratamiento anticoagulante.

Material y métodos:

Estudio de casos y controles retrospectivo de una cohorte de 173 pacientes con anticuerpos antifosfolípidos positivos. Los pacientes fueron clasificados en 3 grupos: SAF, Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y pacientes con serología de aPL positiva sin criterios de SAF. En cada grupo de pacientes se determinó mediante la técnica ELISA la positividad frente a los nuevos anticuerpos anti-fosfatidilserina/antiprotombina IgG e IgM, anticardiolipina IgA y anti- β 2-glicoproteína IgA.

Resultados y conclusiones:

- Los anticuerpos anti-PSPT IgM fueron los más prevalentes de los nuevos autoanticuerpos abordados en la cohorte analizada.
- Más de la mitad de los pacientes con clínica trombótica fueron positivos para alguno de los nuevos aPL estudiados, sobre todo, aPSPT, aunque ninguno parece aportar significación clínica respecto a los aPL establecidos en los criterios.
- Los aPSPT no parecen ser los responsables de todos los resultados de AL positivo, por lo que no consideramos que sean una alternativa diagnóstica a las pruebas de coagulación.

Palabras clave:

Síndrome antifosfolípido, autoanticuerpos, Lupus eritematoso sistémico, trombosis, patología obstétrica.

Abstract

The diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) requires both clinical evidence and the confirmed presence of antiphospholipid antibodies (Criteria of Sydney 2006). However, in recent years due to the appearance of seronegative SAFs (patients with a clinical profile suggestive of APS but persistently negative for aPL of routine use), it became necessary to search for new antigenic targets.

Objectives:

- To determine the frequency of new autoantibodies in the different study groups.
- To determine the association of the new autoantibodies with the clinical manifestations of the disease and to describe whether they provide an additional value to the characterization of APS.
- To evaluate the impact of the use of antibodies against the phosphatidylserine / prothrombin complex (PS / PT), instead of the lupus anticoagulant (AL), as a substitute in the follow-up of SAF patients on anticoagulant therapy.

Material and methods:

Retrospective case-control study of a cohort of 173 patients with positive antiphospholipid antibodies. Patients were classified in 3 groups: SAF, Systemic Lupus Erythematosus (SLE), and patients with positive aPL serology without SAF criteria. Positivity to the new anti-phosphatidylserine / antiprothrombin IgG and IgM antibodies, anticardiolipin IgA and anti- β 2-IgG glycoprotein were determined in each patient group.

Results and conclusions:

- Anti-PSPT IgM antibodies were the most prevalent of the new autoantibodies addressed in the cohort analyzed.
- More than half of the patients with a thrombotic clinic were positive for some of the new aPLs studied, mainly aPSPT, although none appear to have clinical significance regarding the aPL established in the criteria.
- aPSPTs do not appear to be responsible for all positive AL results, so we do not consider them to be a diagnostic alternative to coagulation tests.

Key words:

Antiphospholipid syndrome, autoantibodies, systemic lupus erythematosus, thrombosis, obstetric pathology.

Fundamento

El síndrome antifosfolípido (SAF), es considerado la causa más frecuente de trombofilia adquirida en la población general. Se trata de una enfermedad autoinmune definida por la aparición de eventos clínicos típicos y la evidencia de laboratorio de anticuerpos anti-fosfolípidos (aPL) persistentemente positivos. La prevalencia de aPL en la población general oscila de 1-5%. Sin embargo, sólo una pequeña minoría desarrollarán el síndrome: algunas estimaciones sitúan la incidencia en 5 nuevos casos por 100.000 habitantes al año y la prevalencia en torno a 40-50 casos por cada 100.000 habitantes.

El SAF puede ocurrir como una enfermedad aislada –SAF primario- o aparecer en el contexto de otras enfermedades –SAF secundario- generalmente lupus eritematoso sistémico (LES), aunque también puede asociarse a otras muchas enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide (AR), esclerosis sistémica; a infecciones víricas como el VIH, bacterianas como la enfermedad de Lyme, parasitarias como la malaria; fármacos como la procainamida, quinidina y entidades neoplásicas (leucemias, linfomas).

El cuadro clínico típico del SAF se caracteriza por fenómenos trombóticos – arteriales, venosos y de microvasculatura- así como patología obstétrica.

Los mecanismos exactos que determinan el origen del síndrome son desconocidos. Dado que la presencia de aPL en plasma no siempre tiene repercusión clínica, se hipotetiza con la existencia de dos pasos en el desarrollo del SAF: en el primero o “first hit” tendría lugar la síntesis de autoanticuerpos en pacientes susceptibles tras la exposición a agentes infecciosos, toma de ciertos fármacos o en el seno de enfermedades reumáticas; ello determinaría un estado protrombótico que en presencia de un nuevo fenómeno o “second hit” como serían factores de riesgo cardiovascular (tabaco, HTA, DM, dislipemia...) u otras condiciones procoagulantes (inflamación, estrógenos, neoplasias, inmovilización, cirugía, embarazo, trombofilias hereditarias...) llevaría al desarrollo de la clínica trombótica.

La patogenia obstétrica es más compleja: el estado de hipercoagulabilidad descrito en los fenómenos trombóticos, es en este contexto causante de la trombosis y vasculopatía de las arterias espirales placentarias que determina la insuficiencia uteroplacentaria responsable de la pérdida fetal.

El tratamiento habitual en los pacientes con SAF es, en general, la anticoagulación (en aquellos pacientes que hayan presentado eventos trombóticos) o bien la antiagregación (en pacientes con morbilidad obstétrica) asociada o no a anticoagulación, según las características del evento y del paciente). No obstante, aún no existe un claro consenso acerca del tiempo que se debe mantener este tratamiento. En los pacientes con clínica trombótica, lo habitual es mantener el tratamiento anticoagulante de manera indefinida, aun con el riesgo significativo de efectos secundarios que ello supone, como la hemorragia. La investigación actual se centra en la selección de componentes del sistema del complemento, interferir con la activación

celular mediada por aPL y el uso de péptidos adaptados para bloquear la subpoblación patogénica de aPL.

En 1999, expertos internacionales desarrollaron los criterios clínicos y de laboratorio para definir el SAF que se conocieron como los Criterios de Sapporo. Estos criterios fueron posteriormente actualizados en 2006 en una reunión en Sydney y ahora se conocen como criterios de Sapporo actualizados o Criterios de Sydney (ver "Anexo I")

Los criterios clínicos incluyen trombosis venosa, arterial o de vaso pequeño confirmado por imagen o histología, más comúnmente tromboembolismo venoso y / o de las extremidades inferiores; o complicaciones del embarazo que pueden atribuirse a insuficiencia placentaria, es decir, uno o más abortos en fetos sanos de más de 10 semanas de gestación, tres o más abortos en fetos sanos de menos de 10 semanas de gestación o, uno o más nacimientos prematuros por complicaciones obstétricas tales como preeclampsia, eclampsia o insuficiencia placentaria.

Los criterios de laboratorio requieren de una prueba de laboratorio positiva para anticuerpos antifosfolípidos (aPLs) en 2 o más ocasiones con al menos 12 semanas de diferencia.

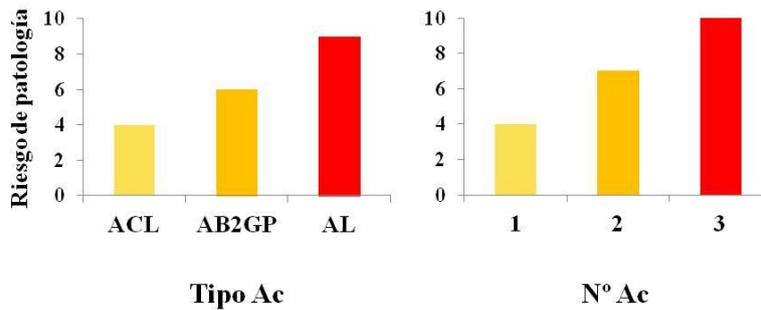
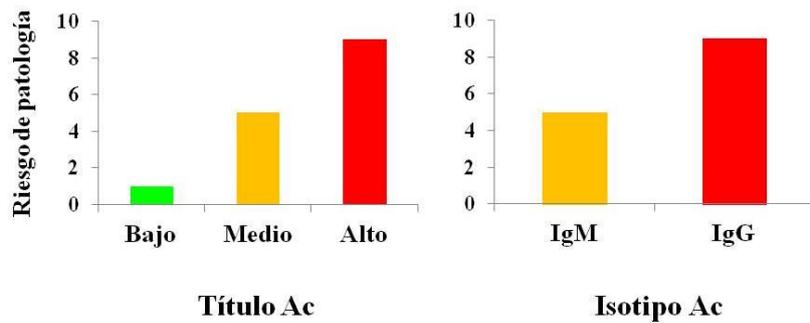
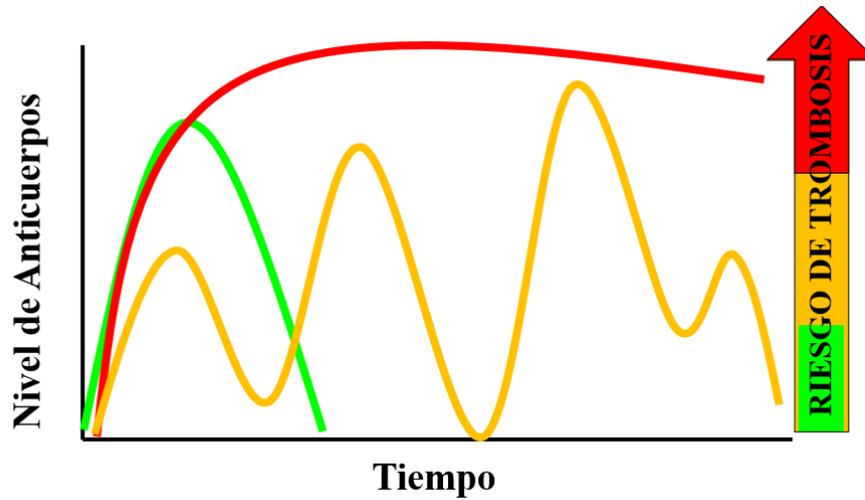
El espectro clínico del SAF no queda limitado únicamente a los criterios del mismo; existen una serie de manifestaciones que sin formar parte de éstos pueden resultar muy sugestivas del cuadro: trombocitopenia, valvulopatía cardíaca, manifestaciones cutáneas como úlceras, lívido reticularis, y tromboflebitis superficial; nefropatía asociada al SAF, manifestaciones neurológicas como migraña, epilepsia, demencia, alteraciones cognitivas, cuadro esclerosis múltiple-like o mielopatía transversa; anemia hemolítica, osteonecrosis, insuficiencia adrenal, hemorragia pulmonar alveolar y clínica ocular como amaurosis fugax, entre otras. Dentro del SAF obstétrico podemos encontrar: complicaciones como placenta abrupta, nacimientos prematuros, dos o más fallos de fertilización in vitro no explicados.

Los aPLs son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos contra fosfolípidos o complejos de proteína / fosfolípidos. Actualmente, los aPL que se evalúan para el diagnóstico de SAF son anticoagulante lúpico (AL), anticuerpos anticardiolipina IgG y/o IgM (aCL), anticuerpos anti β 2 glucoproteína I IgG y/o IgM (β 2GPI).

El AL es el aPL que mayor riesgo trombótico confiere, siendo este riesgo máximo en aquellos pacientes que presentan triple positividad (aCL, aB2GP-I y AL); de igual manera, los títulos altos de aPL y la triple positividad se asocian a una mayor tasa de complicaciones obstétricas, incluso en pacientes correctamente tratadas.

Según datos de múltiples estudios, los aPL pueden fluctuar en su nivel y con frecuencia se negativizan, situación que se relaciona con una menor frecuencia de procesos clínicos patológicos (especialmente si dicha negativización es persistente). Por el contrario, los aPL persistentes y/o a títulos altos se han asociado con mayor frecuencia de eventos clínicos característicos del SAF, que pueden satisfacer o no el criterio clínico para el diagnóstico (dado lo restrictivo de los criterios diagnósticos).

También se ha descrito como perfil de bajo riesgo la positividad aCL de forma aislada, transitoria y/o a títulos bajos.



Se ha descrito la negativización de los aPL incluso en pacientes diagnosticados de SAF. En estos casos, la suspensión del tratamiento antitrombótico y/o anticoagulante podría ser una opción presumiblemente segura, siempre en pacientes seleccionados y con aPL negativos o a títulos bajos de forma persistente.

Sin embargo, en los últimos años debido a la aparición de los SAF seronegativos (SN), es decir, pacientes con un perfil clínico sugestivo de SAF (trombosis, abortos espontáneos recurrentes o pérdida fetal), pero que persistentemente son negativos para los aPL de uso rutinario, se hizo necesario buscar nuevas dianas antigénicas, tales

como complejo vimentina / cardiolipina; y nuevos enfoques metodológicos como la inmunotinción de TLC para refinar el diagnóstico de laboratorio del SAF.

Se han sugerido varias explicaciones posibles para estos casos "seronegativos": o bien el diagnóstico es incorrecto, las pruebas aPL positivas previas se han vuelto negativas o, como parece más probable, la gama actual de pruebas es inadecuada. Este último puede depender de los límites de los enfoques técnicos tradicionales o de la existencia de diferentes dianas antigénicas.

Como la trombosis venosa profunda, el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular son las principales causas de morbilidad y mortalidad en el SAF, es obligatorio identificar entre los pacientes llamados "seronegativos" aquellos que necesitan trombotoprofilaxis secundaria a largo plazo. Del mismo modo, para las mujeres con antecedentes de abortos tempranos recurrentes o pérdida fetal, un diagnóstico de SAF los dirige hacia tratamientos que mejoran significativamente la tasa de nacidos vivos.

A continuación, se detallan las dianas antigénicas de interés actual en el SAF y los autoanticuerpos dirigidos frente a ellas.

Anticuerpos contra β 2-GPI

La B2GPI, también conocida como apolipoproteína H, es el principal autoantígeno en SAF. McNeil *et al.* Identificaron que la unión de aPL a cardiolipina requiere la presencia de un cofactor de proteínas, la apolipoproteína β 2-GPI, que es un miembro de la familia de control del complemento y se considera como un inhibidor natural de la coagulación. Inhibe los factores procoagulantes como el factor XI / XIa y la trombina, inhibe la angiogénesis, interactúa con los componentes de la placa aterosclerótica, con el receptor de plaquetas (la glicoproteína Ib-IX-V) y con el factor von Willebrand (vWF).

Este anticuerpo, que circula como monómero, consiste en cinco repeticiones de proteínas altamente homólogas o "dominio de sushi". El quinto dominio de sushi contiene un bucle de inserción flexible, parcialmente hidrófobo, que se ancla a los fosfolípidos y un enlace disulfuro extra, que le permite interactuar con fosfolípidos aniónicos, es decir cargados negativamente, tales como fosfatidilserina o cardiolipina.

La B2-GPI tiene propiedades anticoagulantes naturales *per se*, pero también puede unirse a la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) para neutralizar sus efectos proinflamatorios. Los complejos oxLDL / β 2-GPI son inmunogénicos y se ha demostrado que los autoanticuerpos contra los complejos oxLDL / β 2-GPI se correlacionan fuertemente con la trombosis arterial en pacientes con LES y SAF.

Los anticuerpos anti- β 2-GPI representan una prueba altamente específica para el diagnóstico de SAF. La correlación entre la positividad de anti- β 2-GPI sola y la trombosis o la pérdida fetal es controvertida, probablemente debido a la pobre estandarización de este ensayo. Se ha demostrado que la calidad del β 2-GPI purificado utilizado y el recubrimiento de la placa ELISA influyen fuertemente en el resultado.

Los anti- β 2-GPI comprenden una familia de anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de la proteína. En los últimos años, varios estudios mostraron que los anticuerpos contra el dominio I (DI), específicamente glicina40 y arginina43, tienen buena correlación con la trombosis y la morbilidad del embarazo. Este hallazgo se confirmó en 2009, cuando 442 pacientes, positivos para anticuerpos anti-b2GPI, se inscribieron en un estudio multicéntrico doble ciego. Doscientos cuarenta y tres de 442 (55%) tenían anticuerpos anti-DI, de los cuales el 83% tenía una historia de trombosis con un odds ratio de 3,5 (IC del 95%: 2,3,5,4) para la trombosis. La especificidad por el DI se encontró en la mayoría de los pacientes con SAF y se asociaron significativamente con LA y trombosis venosa.

Sin embargo, se necesitan estudios clínicos prospectivos adicionales y datos in vivo sobre la causalidad del anti-dominio I en SAF antes de que este anticuerpo pueda agregarse a los criterios diagnósticos establecidos.

Por último, B2GPI es susceptible a la escisión por oxidorreductasas que circulan en plasma humano y reducen las cisteínas del doble enlace disulfuro a tioles libres. Estos tioles libres pueden cuantificarse usando un nuevo ensayo ELISA que se está desarrollando y pueden ser útiles en el diagnóstico de pacientes positivos al anticuerpo aPL que no presentan ningún evento clínico o en la estratificación del riesgo de un evento trombotico en pacientes con SAF.

IgA Anti- β 2-GPI

Varios estudios han analizado recientemente el papel del isotipo IgA. Numerosos estudios han investigado posibles asociaciones entre niveles elevados de anti- β 2-GPI y manifestaciones clínicas de SAF. En particular, la presencia de IgA anti- β 2-GPI y de IgA aCL parecía estar relacionada con trombosis y trombocitopenia.

Se demostró que las mujeres con abortos espontáneos recurrentes no explicados y muerte fetal expresan IgA anti- β 2-GPI, en ausencia de anticoagulante lúpico (LA). En un reciente estudio de cohorte multicéntrico, que analizó 588 sueros de pacientes con LES, 75 sueros fueron exclusivamente positivos para este isotipo, mostrando una buena correlación con las manifestaciones clínicas de SAF. Recientemente, un estudio sobre 156 pacientes que cumplían los criterios clínicos para el SAF (independientemente de los marcadores serológicos) demostró que el 22,4% de ellos eran positivos para IgA anti- β 2-GPI solo. Al final, los anticuerpos IgA anti- β 2-GPI también se consideran un marcador independiente para el desarrollo de varias manifestaciones tromboticas, como el infarto agudo de miocardio y la isquemia cerebral aguda.

Por tanto, se acuerda que los pacientes con LES y/o SAF deben hacerse la prueba de anticuerpos IgA anti-b2GPI, especialmente cuando otras pruebas aPL son negativas. Sin embargo, para ser incluidos en los criterios de clasificación aprobados para SAF, se necesitan más estudios que comparen ensayos comercialmente disponibles en poblaciones más grandes.

IgA Anticardiolipina

La distribución del isotipo IgA aCL es dependiente de la etnia. La prevalencia de IgA aCL en el LES se mostró en afroamericanos, afrocaribeños e hispanos a un 16%, 21% y 14%, respectivamente. Además, en el 82% de los afro-caribeños aCL-positivos, IgA aCL fue el único isotipo detectado.

Para evaluar la patogenicidad de IgA aCL, se inyectaron ratones con IgA aCLs de pacientes con SAF. Posteriormente, este mismo grupo de ratones desarrolló trombosis.

Otro estudio en el que participaron 100 afroamericanos con LES se encontró una asociación entre niveles elevados de IgA aCL y β 2GPI y trombosis. En otro, se mostró una relación positiva entre altos niveles de IgA aCL y trombocitopenia en pacientes con LES y otras conectivopatías.

Es por esto que se recomienda comprobar IgA aCL en casos de alta sospecha clínica de SAF con anticuerpos anticardiolipina IgG e IgM negativos.

Anticuerpos contra Proteína S / Proteína C

Desde 1993, Oosting *et al.*, sugirieron la existencia de subtipos de aPL, que se dirigen a los complejos de fosfolípidos y a las diferentes proteínas plasmáticas implicadas en el sistema de coagulación.

Por lo tanto, propusieron un mecanismo trombogénico para aPL en el que los anticuerpos se unen a los complejos de fosfolípidos y proteínas de coagulación, incluyendo protrombina, proteína S y proteína C. Varios estudios informaron la presencia de anti-proteína S y / o proteína C en pacientes con SAF, aunque con menos sensibilidad y especificidad en comparación con IgG aCL. Además, los niveles de estos anticuerpos (IgM e IgG) parecen estar relacionados con los trastornos del embarazo y la preeclampsia. Sin embargo, se obtuvieron resultados contradictorios en cuanto a su importancia clínica.

Se dispone de más información sobre su función patológica. Está demostrado que los anticuerpos anti-proteína S son capaces de inhibir la actividad de dicha proteína (PS). La presencia de los anticuerpos anti-proteína C se demostró que se asocia con la resistencia a la activación de la proteína C endógena y un fenotipo trombótico grave en SAF.

Por lo tanto, se estableció la hipótesis de que los anticuerpos anti-proteína C podrán representar un subconjunto diferente de los que definen al SAF y que podrían desempeñar un papel como factor coadyuvante en pacientes SAF con fenotipo trombótico severo.

Anticuerpos contra la protrombina y el complejo de protrombina / fosfatidilserina

La protrombina es una glicoproteína plasmática que se convierte en trombina por tromboplastina extrínseca durante la segunda etapa de la coagulación sanguínea. Los

anticuerpos antiprotrombina fueron reconocidos por primera vez en 1995 y este antígeno se consideró como una proteína cofactor potencial para la detección de aPL. Sin embargo, se obtuvieron resultados contradictorios en cuanto a su importancia clínica. Puede ser debido a que la detección de anticuerpos aPT varía ampliamente de un kit de ELISA a otro.

Sin embargo, en los últimos años, por lo menos dos estudios prospectivos han validado el papel de los anticuerpos anti-protrombina en la predicción del riesgo de trombosis en pacientes con SAF. En particular, un estudio longitudinal a largo plazo (15 años) llevado a cabo por Bizarro *et al.* identificaron anticuerpos anti-protrombina IgG como el predictor más útil de la trombosis en pacientes con LES.

Otros estudios demostraron que la antiprotrombina es también capaz de unirse al complejo protrombina / fosfatidilserina. Bertolaccini *et al.* revelaron una asociación positiva entre la presencia de antiprotrombina / fosfatidilserina (IgG y / o IgM) y trombosis arterial o venosa.

Basándose en los estudios anteriores, aPT y aPS / PT son anticuerpos prometedores que pueden utilizarse potencialmente como marcadores diagnósticos confirmatorios y como indicadores del riesgo de trombosis. Además, pueden ser útiles para identificar algunos pacientes con características clínicas sugestivas de SAF, pero persistentemente negativo para todas las pruebas clásicas para la detección de aPL.

Anticuerpos contra Vimentina / Complejo Cardiolipina

La vimentina es el filamento intermedio de tipo III más abundante del sistema citoesquelético. Localizada en la superficie de neutrófilos apoptóticos y células T, macrófagos activados, plaquetas, células endoteliales vasculares y otros. En búsqueda de nuevos objetivos antigénicos para el diagnóstico de SAF, un enfoque proteómico identifica la vimentina como la principal molécula endotelial reconocido por aPLs.

Este descubrimiento se siguió de una unión *in vitro* de vimentina cargada positivamente a cardiolipina cargada negativamente. Basándose en estos datos, los sueros de SAF fueron probados para la presencia de anticuerpos anti-vimentina / CL. Los resultados mostraron presencia persistente de IgG y / o IgM anti-vimentina / CL en el 92,5% y 80% de los pacientes con APS. Sin embargo, aunque la presencia de estos anticuerpos puede considerarse bastante sensible en estos pacientes, no es muy específica, ya que también se detectaron en una proporción de pacientes con LES o AR. Sin embargo, la detección de estos anticuerpos puede representar una herramienta útil principalmente en aquellos pacientes con características clínicas sugestivas de SAF en los que las pruebas clásicas para la detección de aPL son persistentemente negativas.

Anticuerpos anti Anexina A5 y Anexina A2

Las anexinas son una familia de proteínas dependientes de calcio y de fosfolípidos.

La anexina A5 (AnnA5) es una proteína anticoagulante que se encuentra principalmente en los trofoblastos y las células endoteliales vasculares. Se demostró

que los anticuerpos aPL interfieren con la unión protectora de la anexina A5 al endotelio, conduciendo de este modo a la trombosis ya que promueve la unión competitiva de β 2GPI a fosfolípidos aniónicos expuestos.

El laboratorio de Rand ha desarrollado un ensayo de coagulación para determinar la resistencia a la anexina A5, el cual consiste en dos fases. La primera fase consiste en exponer el suero del paciente a fosfolípidos seguido por centrifugación y lavado del sustrato. Para la segunda fase, se utiliza el mismo sustrato de fosfolípidos para coagular el plasma. Los pacientes con tiempo de coagulación inferior a la referencia se consideran resistentes a la anexina-A5. Varios estudios independientes revelaron que una gran proporción de pacientes con SAF eran resistentes a anexina A5. Se ha propuesto que los anticuerpos anti-AnnA5 estén asociados con las características clínicas de la SAF, incluyendo trombosis y abortos espontáneos recurrentes.

La anexina A2 es un importante sitio de unión para β 2-GPI en la superficie de células endoteliales y monocíticas. Se detectaron anticuerpos dirigidos a anexina A2 en pacientes con SAF en cantidades significativamente mayores en comparación con los individuos sanos o pacientes con LES sin trombosis. Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es bastante baja, ya que los datos recientes sugieren que alrededor del 25% de los pacientes SAF son positivos y además los anticuerpos anti-Anexina A2 también fueron detectados en pacientes que sufren de otras enfermedades autoinmunes, por lo tanto, esto reduce su especificidad. Se necesitan más estudios para determinar su importancia clínica y valor diagnóstico.

Anticuerpos contra los antígenos fosfolípidos

Se ha evaluado el papel diagnóstico y pronóstico de varios autoanticuerpos dirigidos a fosfolípidos con carga negativa, en particular, tres fosfolípidos aniónicos, fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA), que se encuentran en la mayoría de las membranas celulares. Sin embargo, la prueba de estos anticuerpos aPL no mejora la probabilidad de diagnosticar SAF en comparación con las pruebas recogidas en los criterios clásicos.

Algunos investigadores han sugerido que la prueba para localizar anticuerpos aPS, aPI y aPA pueden ayudar a identificar a las mujeres con pérdida recurrente del embarazo (PFR). Sin embargo, tener en cuenta este grupo de anticuerpos en el diagnóstico de SAF sigue siendo controvertido. Los aPS tienen una relevancia particular en el SAF obstétrico porque inhiben el desarrollo e invasión de trofoblasto. Además, aPS puede retardar la formación de sincitiotrofoblasto y disminuir la síntesis de Hcg.

En un estudio sobre 866 mujeres con PFR, 150 (17,3%) fueron positivas para IgG y / o IgM aCL en comparación con 12 de 288 mujeres control sin complicaciones obstétricas previas ($P < 0,001$). Ochenta y siete de 866 mujeres con RPL que dieron negativo para aCL fueron positivos para uno de los otros aPLs. En otro estudio sobre un grupo de 872 mujeres con PFR, 49 de 872 (3,6%) fueron negativas tanto para aCL como para LA, pero positivas para aPS. Estos dos estudios sugieren que un número significativo de mujeres con PFR se habrían perdido si no se incluyeran fosfolípidos aniónicos distintos de aCL en el proceso diagnóstico.

Sin embargo, un obstáculo a menudo enfrentado al tratar de incorporar otros aPLs es la falta de estandarización entre los laboratorios.

A pesar de que aPS ha sido el más ampliamente investigado ya que resultó ser el más prometedor entre los fosfolípidos aniónicos, especialmente en el área de PFR, las condiciones óptimas para su mejor rendimiento clínico y analítico se han de determinar.

Debido a que los pacientes con pruebas persistentemente negativas para aPLs pero con rasgos clínicos muy sugestivos de SAF no pueden ser etiquetados como pacientes con SAF, algunos estudios se centraron en aPE como un posible criterio de laboratorio alternativo para el diagnóstico de este síndrome, tanto por el aumento de la evidencia de este como por su relación con las manifestaciones clínicas de SAF. La fosfatidiletanolamina (PE) contribuye con el 20-50% de los fosfolípidos totales. Además, el PE actúa como anticoagulante, potenciando la actividad de la proteína C activada (APC) en las reacciones de coagulación sanguínea.

Diferentes resultados demuestran el interés en la investigación de los aPE con respecto a las complicaciones obstétricas. De hecho, se ha comunicado que los aPE son significativamente más frecuentes en mujeres con pérdida fetal temprana inexplicada que en aquellas con pérdida fetal temprana explicada o madres sanas. Además, en varios estudios se ha informado de la relación entre los anticuerpos aPE y otras características clínicas del SAF y se ha demostrado la prevalencia de estos anticuerpos en pacientes con trombosis venosa inexplicada.

Otra especificidad identificada en los sueros de pacientes SAF está representada por anticuerpos contra sulfatidas. Las sulfatidas están presentes en diversos tejidos y células y son una de las principales familias de lípidos en el suero. Estas moléculas son glucoesfingolípidos ácidos y están implicadas fisiológicamente en el proceso hemostático. B2-GPI es capaz de unirse a las sulfatidas y los anticuerpos dirigidos contra el complejo sulfatida / β 2-GPI también pueden reaccionar con el complejo CL / β 2-GPI. Estos autoanticuerpos pueden contribuir no sólo a las anomalías hemostáticas, sino también a otras características clínicas del SAF, como síntomas neurológicos y abortos, ya que las sulfatidas están presentes en el tejido nervioso y en el tracto genital femenino.

El SAF sigue siendo un desafío diagnóstico importante en una amplia gama de especialidades, en gran parte debido a cuestiones relacionadas con las pruebas de laboratorio, así como la amplia gama de manifestaciones clínicas de este.

Aunque es el clínico quién finalmente hace el diagnóstico, el laboratorio desempeña un papel importante en muchas etapas del proceso. Los problemas de laboratorio incluyen falta de conocimiento detallado por parte del personal clínico, falta de disponibilidad de pruebas para detectar los autoanticuerpos, problemas con la reproducibilidad y estandarización del ensayo.

Los anticuerpos antifosfolípidos juegan un papel patogénico importante que induce manifestaciones clínicas. Podemos decir que el hallazgo de aPL realmente proporciona la mayor herramienta de estratificación de riesgo para los eventos adversos asociados, como la trombosis. Los pacientes con triple positividad para aCL, LA y anti- β 2-GPI tienen un mayor riesgo de eventos trombóticos que aquellos que eran positivos para sólo una o dos de estas especificidades. En cualquier caso, se debe considerar una combinación de pruebas de aPL al discutir el riesgo de trombosis / morbilidad del embarazo.

En este trabajo lo que queremos es estudiar la utilidad de las pruebas para detectar aPLs que no están incluidos en los criterios de laboratorio definitorios de SAF, en un intento de aumentar el rendimiento diagnóstico.

Objetivos

1. Determinar la frecuencia de los nuevos autoanticuerpos en los diferentes grupos de estudio: SAF, LES y pacientes con serología de aPL positiva sin criterios de SAF.
2. Determinar la asociación de los nuevos autoanticuerpos con las manifestaciones clínicas de la enfermedad y describir si aportan un valor adicional a la caracterización del SAF.
3. Valorar el impacto del uso de los anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protombina (PS/PT), en lugar del anticoagulante lúpico (AL), como sustituto en el seguimiento de los pacientes SAF en tratamiento anticoagulante.

Material y métodos

Pacientes

Se llevó a cabo un estudio de casos y controles retrospectivo en el que se incluyeron pacientes atendidos en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) de Santander (Cantabria, España) que habían cumplido en algún momento el criterio serológico para el diagnóstico de SAF (esto es, de acuerdo con los criterios de Sidney, aCL IgG y/o IgM medidos mediante ensayo inmunoenzimático [ELISA] a títulos medios o altos para el laboratorio donde se realiza el análisis, aB2GP1 IgG y/o IgM medidos mediante ELISA a títulos medios o altos para el laboratorio donde se realiza el análisis y/o actividad. AL detectada según las guías internacionales, con confirmación mediante la misma prueba transcurridas al menos 12 semanas; ver "Anexo I").

Los datos fueron obtenidos de la base de datos proporcionada por el Servicio de Reumatología e Inmunología del HUMV.

Se llevó a cabo la técnica de ELISA para los nuevos aPL (anti-fosfatidilserina/antiprotrombina IgG e IgM, anticardiolipina IgA y anti- β 2-glicoproteína IgA) en el suero de 173 pacientes, los cuales fueron clasificados en tres grupos de estudio:

- Grupo A: pacientes diagnosticados de SAF primario de acuerdo con los criterios diagnósticos de Sidney (2006).
- Grupo B: pacientes que no cumplían el criterio clínico de SAF (es decir, pacientes con aPL positivos pero asintomáticas o con clínica insuficiente para establecer el diagnóstico de SAF).
- Grupo C: pacientes diagnosticados de LES de acuerdo con los criterios de clasificación de LES de la *American College of Rheumatology* (1997), además de haber cumplido en algún momento el criterio serológico (al igual que el resto de las pacientes incluidas en el estudio) o criterios clínicos para diagnóstico de SAF (SAF secundario).

ELISA

Se utilizaron los kits QUANTA Lite ELISA (Inova, San Diego, CA, EEUU).

Antes de llevar a cabo la técnica de ELISA, todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente (20-26°C) y con un agitador tipo vórtex se mezclan para que estén homogéneas.

Se diluye la solución de lavado concentrada 1:40 (en los kits para determinar el anticuerpo anticardiolipina (ACA) la solución de lavado está concentrada a 1:20) añadiendo el contenido del envase con concentrado a 950 ml de agua destilada. Preparar una dilución 1:101 de cada muestra a procesar añadiendo 5 μ l de muestra a 500 μ l de diluyente.

La determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos requiere dos pocillos para cada uno de los calibradores y controles y uno o dos pocillos para cada muestra. Por recomendación hacemos los calibradores y controles por duplicado. En todo ensayo se introduce un control negativo y un control positivo. Si el valor obtenido se escapa del rango establecido, el ensayo se desecha.

A continuación, se prepara la curva estándar. La concentración de anticuerpo se mide en relación a una curva estándar construida con un material de referencia con cinco diluciones.

Procedimiento de Ensayo

Añadimos 100µl de los calibradores, las muestras diluidas de los pacientes, el control negativo de ELISA y el control positivo a los pocillos de la placa. Cubrimos los pocillos y los incubamos 30 minutos a temperatura ambiente en una superficie plana.

Tras la incubación hacemos el lavado. Por decantación de la placa eliminamos el material sobrante. Agregamos 250µl de solución de lavado a todos los pocillos y decantamos. Repetir esta secuencia dos veces más para un total de tres lavados. Invertimos la placa y la golpeamos suavemente en material absorbente para eliminar cualquier fluido residual tras el último lavado. Es importante que cada pocillo está completamente vacío después de cada paso de lavado.

Continuamos agregando 100µl de Conjugado HRP (peroxidasa de rábano picante) a cada pocillo. Debe pipetarse en las condiciones más asépticas posibles y siguiendo buenas técnicas de laboratorio. Se incuba otros 30 minutos y después se realiza de nuevo el lavado.

Agregamos 100µl de Cromógeno TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a cada pocillo e incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. De nuevo agregamos 100µl de solución de parada a cada pocillo. Mantenemos la misma secuencia y temporalización que la efectuada en la adicción de cromógeno. Agitamos suavemente la placa para mezclar bien los pocillos.

Por último, se lee la absorbancia (DO) de cada pocillo a 450nm en un plazo máximo de una hora.

Interpretación de los resultados

En la definición de resultados positivos para los nuevos aPL estudiados en el presente trabajo hemos empleado un punto de corte igual para todos los métodos (30 Unidades). Un resultado positivo (>30) indica la presencia del anticuerpo. Un resultado negativo valores (≤ 30) indica ausencia del anticuerpo.

Los anticuerpos clásicos utilizados en la práctica clínica rutinaria (AL, ACA y A β 2GPI) fueron recogidos de la historia clínica de los pacientes.

El laboratorio de Inmunología del HUMV cuantifica la presencia de los siguientes aPL e isotipos de aPL: ACA de clase IgG e IgM, aB2GP1 de clase IgG e IgM, por tratarse hasta el momento de los establecidos para el diagnóstico de SAF. Estos anticuerpos se determinan por método de ELISA comercial (Aesku Diagnostics, Wendelsheim, Alemania) en fase sólida, similar en pasos al empleado en el presente trabajo, pero con autoantígenos y reactivos distintos.

Los datos del AL se extrajeron de los informes analíticos del Servicio de Hematología del HUMV adjuntos a las historias clínicas.

El laboratorio de Hematología del HUMV realiza las pruebas de detección de actividad AL de acuerdo con las guías actualizadas del *Subcomitee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody (Scientific and Standardization Comitee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis)*.¹¹

Los sueros utilizados en el presente estudio pertenecen a la colección de sueros del servicio de Inmunología del HUMV (Biobanco de Cantabria) y han sido recogidos en estudios aprobados por el CEIC de Cantabria (Protocolo 2007.108).

Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos por la técnica ELISA, se completó la base de datos mencionada previamente para realizar el análisis estadístico. Dicho análisis se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). En el análisis descriptivo se utilizaron frecuencias, porcentajes, medias, y, como medida de dispersión, la desviación típica o estándar. En cuanto al análisis inferencial, en el análisis univariante se aplicó el test de Chi cuadrado (χ^2) para comparar dos variables cualitativas, la prueba de t de Student si una de las variables comparadas era cualitativa dicotómica y la otra era cuantitativa y ANOVA en el caso de comparar una variable cualitativa no dicotómica con otra cuantitativa. Se consideró como estadísticamente significativo todo valor de $p < 0,05$.

Resultados

Características de la cohorte de estudio

De los 173 pacientes incluidos, 78 (45%) pertenecían al grupo A (SAF primario), 60 (34,68%) al grupo B (serología de aPL positiva sin criterio clínico de SAF) y 35 (20,23%) al grupo C (LES).

La **tabla 1** resume las características demográficas, clínicas y de laboratorio de los pacientes.

La mayoría de los pacientes fueron mujeres, con una media de edad al diagnóstico de seropositividad de aPL de $31,9 \pm 5,48$ años.

El FRCV más frecuente entre los pacientes al inicio del estudio fue el tabaquismo: 67 (39%) pacientes eran fumadores o lo habían sido en algún momento de su vida. El resto de factores de riesgo cardiovascular mostraban menor incidencia. Teniendo hipertensión arterial 47 pacientes (27,3%) dislipemia 39 (23%) y, por último, diabetes mellitus que solo la padecen 7 (4,1%) pacientes de los 173 que conforman el estudio.

Desglosando por grupos de estudio la incidencia de los FRCV vemos que el grupo C (LES) abarca el mayor porcentaje de pacientes afectados (42,9% tabaquismo; 48,6%

HTA; 40% dislipemia). En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre grupos respecto a los siguientes FRCV: tabaquismo, HTA y dislipemia ($p < 0,05$).

De los 173 pacientes, 44 (25,2%) habían sufrido eventos trombóticos antes del comienzo del estudio. De los cuales 30 (38,5%) pertenecen al grupo A (SAF primario) y 14 (40%) pertenecen al grupo C (LES). Como era de esperar, en el grupo B (serología positiva para aPL sin criterio clínico de SAF) no se ve ningún evento trombótico.

El territorio afectado con más frecuencia es el arterial, 29 (16,9%) pacientes, seguido del venoso 13 (7,6%).

El antecedente de morbilidad obstétrica global estaba presente en 53 (30,8%) de las pacientes: 42 (53,8%) del grupo SAF primario, 7 (11,9%) del grupo con serología de aPL positiva y 4 (11,4%) del grupo con LES. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Los eventos obstétricos que forman parte de los criterios de Sídney son:

→ 3 ó más pérdidas gestacionales (PG) espontáneas antes de la semana 10 de gestación, tras haberse excluido anomalías cromosómicas de los progenitores y anomalías anatómicas u hormonales de la madre (Criterio Sídney 1).

→ Pérdidas gestacionales espontáneas después de la semana 10 de gestación con morfología normal en ecografía prenatal o en la exploración posnatal inmediata (Criterio Sídney 2).

→ Parto pretérmino antes de la semana 34 de gestación por preeclampsia grave, eclampsia o insuficiencia placentaria (Criterio Sídney 3).

Como se puede ver en la **tabla 1** estos criterios se han denominados Criterios Sídney 1, 2 y 3 respectivamente.

Por lo tanto, al observar la clínica obstétrica de forma desglosada, los eventos obstétricos que forman parte de los criterios de Sídney, fueron significativamente más frecuentes en el grupo con SAF primario respecto al grupo de serología de aPL positiva y grupo de pacientes con LES.

Los pacientes del grupo B (serología aPL positiva) presentan un 30% de abortos precoces, en número ≤ 2 . Por lo tanto, aunque presentan clínica sugestiva no reúnen el criterio estricto de la enfermedad.

Hay diferencias significativas en cuanto a los criterios Sídney 1 y 2 ($p = 0,017$ y $< 0,001$), pero no se encontraron diferencias significativas entre grupos en cuanto al criterio 3 ($p = 0,156$).

En cuanto a las condiciones de laboratorio usadas para los diferentes grupos de estudio fueron: clase y carga de anticuerpos.

Los datos relativos a las clases de anticuerpos sitúan a los anticuerpos anticardiolipina (ACA) 144 (84,2%) pacientes de 173, como la clase más asociada al

grupo C (LES) (33 pacientes, 93,4%), con una significación estadística del 0,005. El anticuerpo anticardiolipina en el resto de grupos a estudio (A y B) también tiene un porcentaje de positividad muy elevado (76,6% y 88,1% respectivamente).

El anticoagulante lúpico (AL), 41 (50,6%) pacientes, es por otro lado la clase de anticuerpo más asociada a LES, con una frecuencia de 81,3% y una significación estadística de 0,005. No se encuentran diferencias en cuanto a los anticuerpos anti- β 2-glicoproteína en ninguno de los grupos.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto a la carga de autoanticuerpos entre los 3 grupos.

Tabla 1. Características demográficas, clínicas y de laboratorio.

	Total n=173	Grupos estudio			p
		SAF n=78	Serología aPL n=60	LES n=35	
Edad, media \pm DE	31,9 \pm 5,48	32,3 \pm 6,9	31,6 \pm 3,3	31,7 \pm 3,9	0,896
Sexo masculino, n(%)	17 (10,1%)	8 (10,5%)	8 (13,6%)	1 (3%)	0,272
FRCV					
Tabaquismo	67 (39%)	39 (50%)	13 (22%)	15 (42,9%)	0,003
HTA	47 (27,3%)	22 (28,2%)	8 (13,6%)	17 (48,6%)	0,001
DL	39 (23%)	18 (23,1%)	7 (11,9%)	14 (40%)	0,007
DM	7 (4,1%)	5 (6,4%)	1 (1,7%)	1 (2,9%)	0,354
Trombosis	44 (25,2%)	30 (38,5%)	0	14 (40%)	<0,001
Arterial	29 (16,9%)	19 (24,4%)	0	10 (28,6%)	<0,001
Venosa	13 (7,6%)	10 (12,8%)	0	3 (8,6%)	<0,001
Ambas	3 (1,7%)	2 (2,4%)	0	1 (2,9%)	<0,001
Clínica obstétrica	53 (30,8%)	42 (53,8%)	7 (11,9%)	4 (11,4%)	<0,001
Criterio Sidney 1	55 (31,8%)	32 (41%)	8 (30%)	5 (14,3%)	0,017
Criterio Sidney 2	22 (12,7%)	21 (26,9%)	0	1 (2,9%)	<0,001
Criterio Sidney 3	3 (1,7%)	3 (3,8%)	0	0	0,156

ACA	144 (84,2%)	59 (76,6%)	52 (88,1%)	33 (93,4%)	0,005
aB2GP-I	125(73,1%)	58 (75,3%)	41 (69,5%)	26 (74,3%)	0,737
AL	41 (50,6%)	19 (52,8%)	9 (31%)	13 (81,3%)	0,005
Carga anticuerpos					
1	54 (31,6%)	27 (35,1%)	21 (35,6%)	6 (17,1%)	0,135
2	74 (43,3%)	28 (36,4%)	28 (47,5%)	18 (51,4%)	
3	43 (25,15)	22 (28,6%)	10 (16,9%)	11 (31,4%)	

SAF, síndrome antifosfolípido; aPL, anticuerpos antifosfolípido; LES, lupus eritematoso sistémico; *p*, significación estadística; DE, desviación estándar; FRCV, factores de riesgo cardiovascular, AF antecedentes familiares; HTA, hipertensión arterial; DL, dislipemia; DM, diabetes mellitus; ACA, anticuerpo anticardiolipina incluido en los criterios diagnósticos; aB2GP-I, anti-β2-glicoproteína 1; AL, anticoagulante lúpico.

*El grupo B (serología aPL positiva) han tenido abortos precoces, pero en número ≤2.

Frecuencia de los nuevos autoanticuerpos

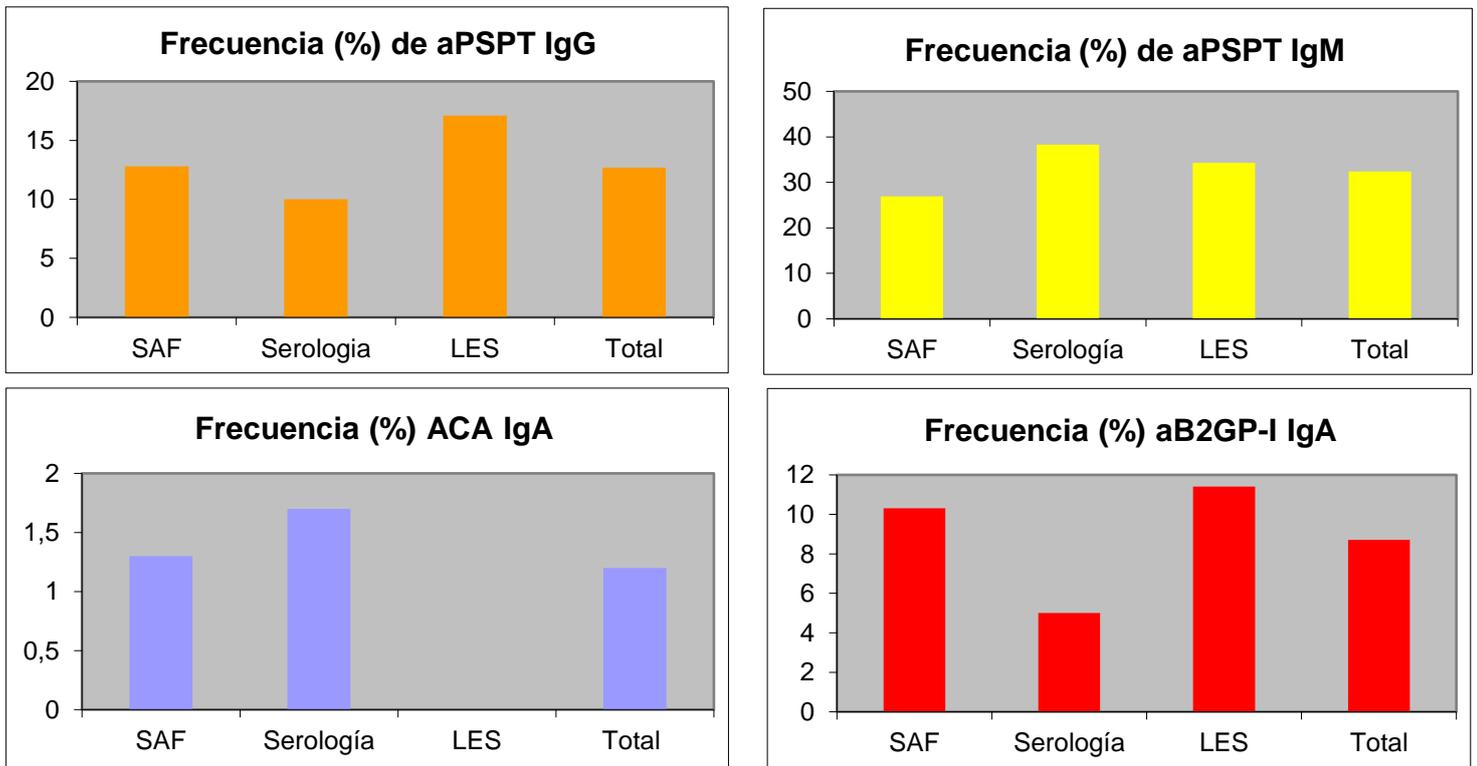
El primer objetivo del trabajo consistía en determinar la frecuencia de los nuevos autoanticuerpos (anti-fosfatidilserina/antiprotrombina IgG e IgM, anticardiolipina IgA y anti-β2-glicoproteína IgA) en los diferentes grupos de estudio.

En la **figura 2** podemos observar cuatro diagramas de barras en los que se representan la frecuencia de dichos anticuerpos.

Se observa una frecuencia variable de los distintos autoanticuerpos, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos de estudio.

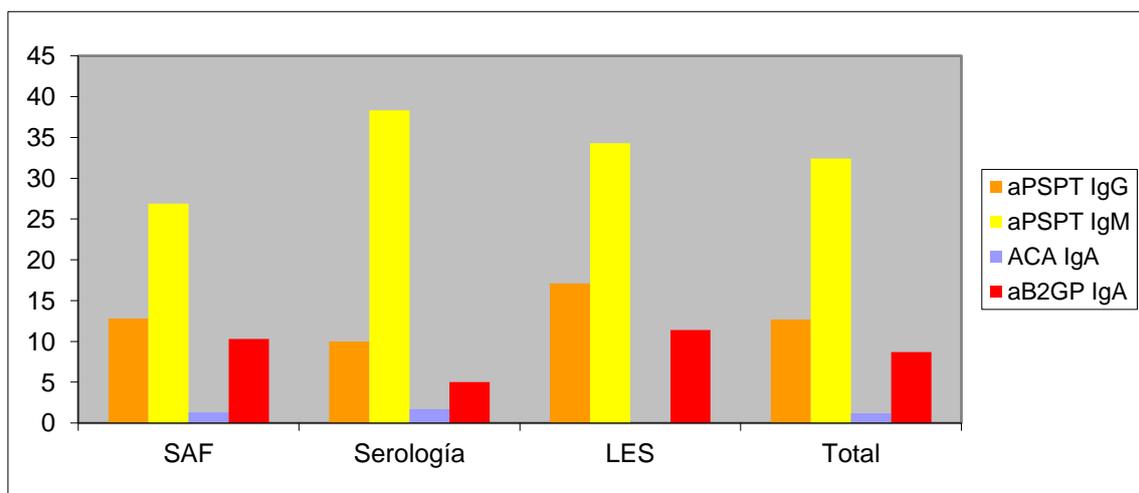
En la **figura 3** se observa que el anticuerpo fosfatidilserina/antiprotrombina IgM (aPSPT IgM) tiene las frecuencias más altas en todos los grupos a estudio (26,9% en SAF, 38,3% en serología aPL positiva, 34,3% en LES). Le siguen en frecuencia los anticuerpos aPSPT IgG y aB2GPI IgA. En cuanto al anticuerpo anticardiolipina IgA en general las frecuencias en los grupos de estudio son mínimas (1,3% en SAF, 1,7% en serología aPL positiva), siendo nula en el grupo LES puesto que ninguno de los 35 pacientes que comprenden este grupo han sido positivos para dicho anticuerpo.

Figura 2. Frecuencia nuevos autoanticuerpos en los grupos de estudio.



aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; ACA, anticuerpo anticardiolipina; aB2GP-I, anti- β 2-glicoproteína 1.

Figura 3. Figura resumen de las frecuencias de los nuevos autoanticuerpos por grupos de estudio.



aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; ACA, anticuerpo anticardiolipina; aB2GP-I, anti- β 2-glicoproteína 1.

Asociación de los nuevos autoanticuerpos con las manifestaciones clínicas

Otro de los objetivos principales del estudio es describir si los nuevos autoanticuerpos aportan un valor adicional a la caracterización del SAF y la asociación que tienen los nuevos autoanticuerpos con manifestaciones clínicas trombóticas y obstétricas.

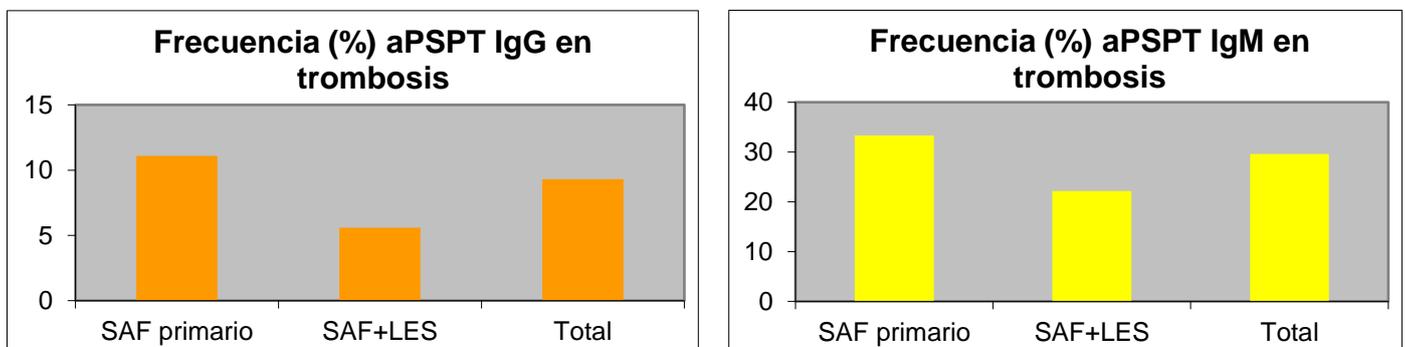
En las figuras 4,5,6 y 7 se representan con diagramas de barras las frecuencias de los nuevos anticuerpos por grupos de estudio, pero dividiéndolo en función de si tienen clínica trombótica y obstétrica.

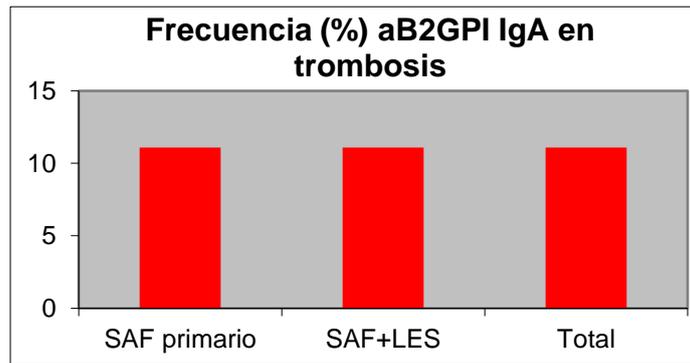
Por lo tanto, los pacientes fueron clasificados en función de si tenían clínica trombótica u obstétrica y los grupos a estudio son: SAF primario, SAF+LES y por último SAF total. El grupo C inicialmente lo conformaban pacientes LES además de haber cumplido en algún momento el criterio serológico o el criterio clínico (SAF secundario) para el diagnóstico de SAF.

El nuevo grupo de estudio SAF+LES está definido únicamente por los pacientes LES que presentan algún criterio clínico para ser diagnosticados como SAF secundario. En este nuevo grupo se pierden aquellos pacientes LES que solo tienen serología aPL positiva (13 pacientes de los 35 que conforman el grupo C inicial). Por lo tanto, el nuevo grupo SAF+LES está formado por 22 pacientes que presentarán clínica trombótica (18), obstétrica (5) o ambas (1).

En las **figuras 4 y 5** se representan los pacientes que presentan clínica trombótica. De los 173 pacientes incluidos en el estudio habíamos descrito que 44 (25,2%) presentaban eventos trombóticos. De los 44 pacientes que sí que presentan trombosis solo 5 (9,3%) son positivos para aPSPT IgG, 16 (29,6%) para aPSPT IgM y 6 (11,1%) para aB2GPI IgA. Anticardiolipina IgA no fue positivo para ninguno de estos pacientes. Por eso en la **figura 6** se hace un diagrama de barras total. En él podemos ver como por grupos de estudio el anticuerpo más prevalente es aPSPT IgM. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los grupos a estudio.

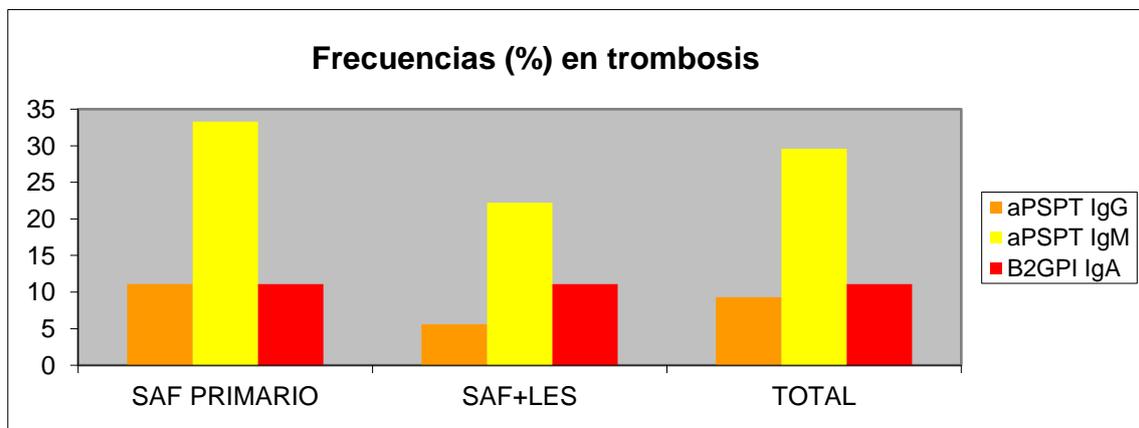
Figura 4. Frecuencia nuevos autoanticuerpos por grupos de estudio en los pacientes con clínica trombótica.





aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; aB2GP-I, anti-β2-glicoproteína 1.

Figura 5.

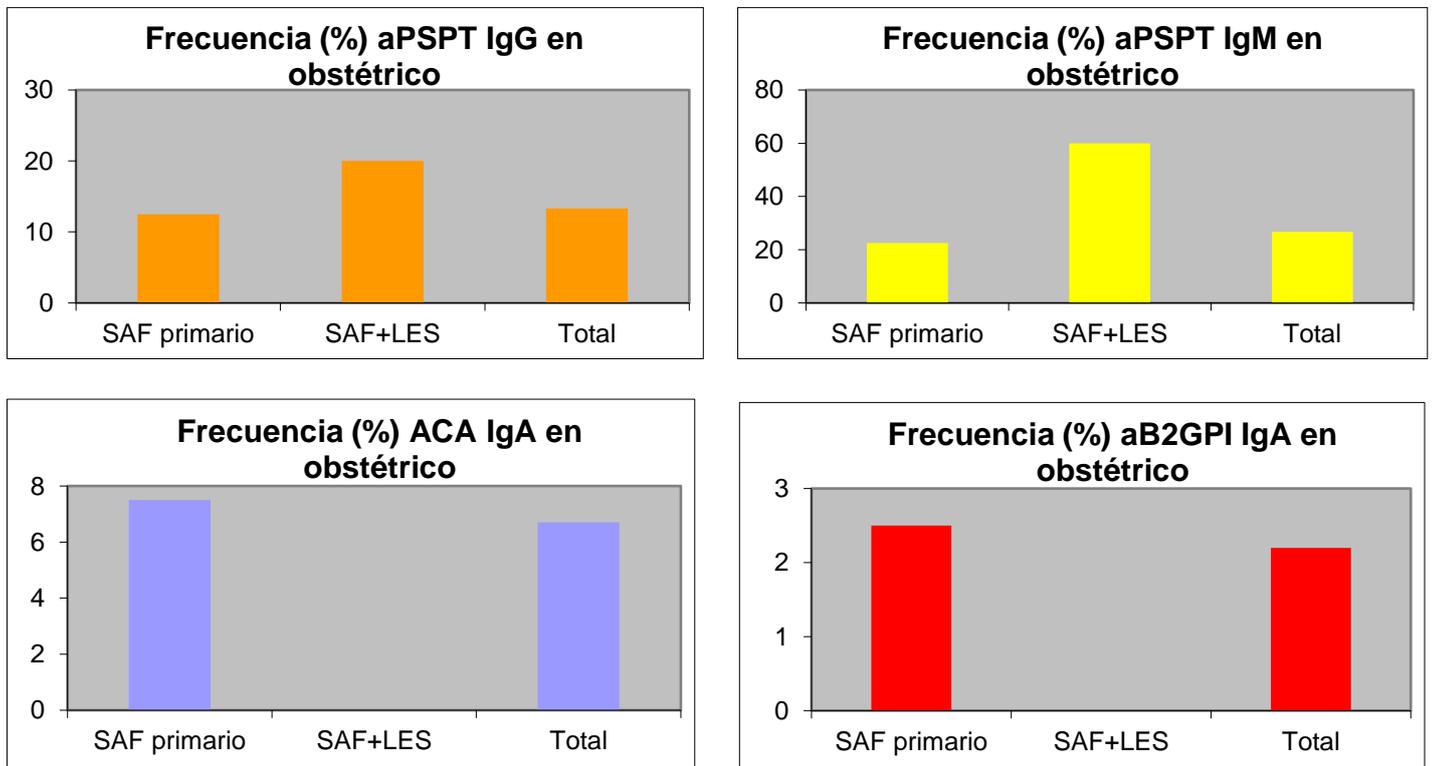


aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; ACA, anticuerpo anticardiolipina; aB2GP-I, anti-β2-glicoproteína 1.

En las **figuras 6 y 7** se representan los pacientes con clínica obstétrica. Como se describió anteriormente de los 173 pacientes del estudio, 53 (30,8%) presentaban eventos obstétricos que cumplen criterios de Sídney. De los 53 pacientes, 6 (13,3%) fueron positivos para aPSPT IgG, 12 (26,7%) para aPSPT IgM, 3 (6,7%) para ACA IgA y un único (2,2%) paciente dio positivo para aB2GPI IgA. Solo 22 pacientes de los 53 con clínica obstétrica dieron positivo para alguno de los nuevos anticuerpos a estudio. En la **figura 8** con la representación global de los datos, aPSPT IgM, al igual que en las anteriores, sigue siendo el anticuerpo con mayor frecuencia en ambos grupos de estudio. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos el aPSPT IgM, fue más frecuente en las pacientes con LES+SAF obstétrico ($p=0,109$).

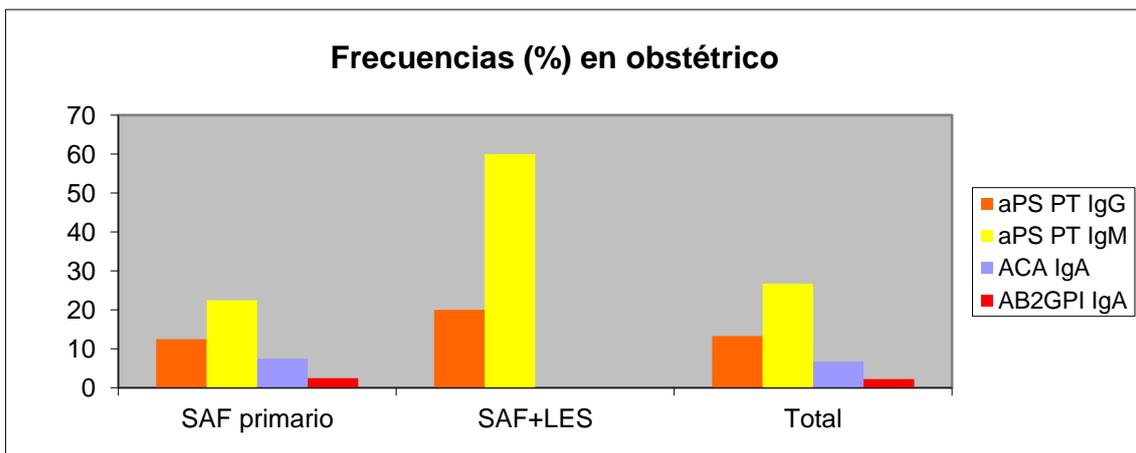
Por otra parte, los ACA y aB2GPI IgA, aunque con una frecuencia baja, sólo fueron positivos en pacientes con SAF primario.

Figura 6. Frecuencia nuevos autoanticuerpos por grupos de estudio en los pacientes con clínica obstétrica.



aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; ACA, anticuerpo anticardiolipina; aB2GP-I, anti- β 2-glicoproteína 1.

Figura 7.



aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; ACA, anticuerpo anticardiolipina; aB2GP-I, anti- β 2-glicoproteína 1.

Como ya se mencionó previamente entre los objetivos de este estudio estaban averiguar si había asociación de los nuevos autoanticuerpos con la clínica trombótica y obstétrica y si estos anticuerpos aportan un valor adicional a la caracterización del SAF. En las **figuras 4, 5, 6 y 7**, ya comentadas, observábamos la frecuencia de los nuevos anticuerpos en los grupos de estudio en función de la clínica que presentaban. Para precisar aún más el valor de los nuevos anticuerpos se han realizado dos **tablas (8 y 9)** en las que se comparan dichos anticuerpos con los que están incluidos en los criterios de laboratorio del SAF y todo esto una vez más en función de si presentan clínica obstétrica o trombótica. Por lo tanto, se han utilizado los mismos grupos de estudio que para las figuras anteriores (SAF primario, SAF+LES y SAF total).

Lo que nos interesa de estas tablas es ver aquellos pacientes que son negativos para los anticuerpos incluidos en los criterios de laboratorio, pero al mismo tiempo son positivos para alguno de los nuevos anticuerpos (anti-fosfatidilserina/antiprotrombina IgG e IgM, anticardiolipina IgA y anti-β2-glicoproteína IgA).

Como se muestra en la **tabla 8**, ninguno de los anticuerpos nuevos incluidos en el presente estudio presenta una ventaja adicional en la identificación de los pacientes con clínica trombótica, respecto a los anticuerpos clásicos.

Tabla 8. Relación entre los nuevos anticuerpos a estudio y los anticuerpos incluidos en los criterios de Sídney en pacientes con clínica trombótica.

Clínica Trombótica

		aPSPT IgM		aPSPT IgG		ACA IgA		aB2GP IgA	
		-	+	-	+	-	+	-	+
ACA	-	5 (13.2%)	3 (18.8%)	7 (14.3%)	1 (20%)	8 (14.8%)	0	8 (16.7%)	0
	+	33 (86.8%)	13 (81.3%)	42 (85.7%)	4 (80%)	46 (85.2%)	0	40 (83.3%)	6 (100%)
aB2GP	-	11 (28.9%)	4 (45%)	12 (26.5%)	2 (40%)	15 (27.8%)	0	14 (29.2%)	1 (16.7%)
	+	27 (71.1%)	12 (75%)	36 (73.5%)	3 (60%)	39 (72.2%)	0	34 (70.8%)	5 (83.3%)
AL	-	6 (25%)	1 (12.5%)	5 (17.9%)	2 (50%)	7 (21.9%)	0	14 (29.2%)	1 (16.7%)
	+	18 (75%)	7 (87.5%)	23 (82.1%)	2 (50%)	25 (78.1%)	0	34 (70.8%)	5 (83.3%)

aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; ACA, anticuerpo anticardiolipina; IgA inmunoglobulina A; aB2GP-I, anti-β2-glicoproteína 1; AL, anticoagulante lúpico.

Como se muestra en la **tabla 9** en los pacientes con clínica obstétrica (n=53), aPSPT IgM e IgG sí que podrían tener cierto valor diagnóstico en los pacientes con AL negativo.

Tabla 9. Relación entre los nuevos anticuerpos a estudio y los anticuerpos incluidos en los criterios de Sídney en pacientes con clínica obstétrica.

Clínica Obstétrica

		aPSPT IgM		aPSPT IgG		ACA IgA		aB2GP IgA	
		-	+	-	+	-	+	-	+
ACA	-	9 (28.1%)	1 (8.3%)	9 (23.7%)	1 (16.7%)	9 (20.9%)	1 (100%)	8 (19.5%)	2 (66.7%)
	+	23 (71.9%)	11 (91.7%)	29 (76.3%)	5 (83.3%)	34 (79.1%)	0	33 (80.5%)	1 (33.3%)
aB2GP	-	9 (28.1%)	3 (25%)	12 (31.6%)	0	12 (27.9%)	0	12 (29.3%)	0
	+	23 (71.9%)	9 (75%)	26 (68.4%)	6 (100%)	31 (72.1%)	1 (100%)	29 (70.7%)	3 (100%)
AL	-	10 (71.4%)	2 (66.7%)	11 (78.6%)	1 (33.3%)	11 (68.8%)	1 (100%)	12 (29.3%)	0
	+	4 (28.6%)	1 (33.3%)	3 (21.4%)	2 (66.7%)	5 (31.3%)	0	29 (70.7%)	3 (100%)

aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; ACA, anticuerpo anticardiolipina; IgA inmunoglobulina A; aB2GP-I, anti-β2-glicoproteína 1; AL, anticoagulante lúpico.

Valor de los anticuerpos antifosfatidilserina/protombina en pacientes AL positivo

Otro de los objetivos del trabajo, consistía en valorar el impacto del uso de los anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protombina (PS/PT) IgG e IgM, en lugar del anticoagulante lúpico (AL), como sustituto en el seguimiento de los pacientes SAF en tratamiento anticoagulante (**Tabla 10**).

Como es bien sabido, en pacientes anticoagulados resulta difícil realizar y/o interpretar las pruebas que se utilizan en rutina para determinar el AL.

Por lo tanto, la disponibilidad de un test que no esté interferido por la anticoagulación permitiría confirmar y/o monitorizar la actividad del AL de un determinado suero. En ese sentido, algunos autores han sugerido que los anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protombina podrían ser de utilidad en este escenario clínico.

De los 173 pacientes que conforman el estudio se determinó el AL a 81. De los cuales fueron positivos 41 (50,6%). En el grupo de los pacientes positivos para AL, 6 (14,6%) lo son también para aPSPT IgG, y 14 (34,1%) para aPSPT IgM.

Solo 20 pacientes de los 41 que eran positivos para AL tenían el nuevo anticuerpo aPSPT, lo que representa un 48,7% de los pacientes. Además, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas para ninguno de los anticuerpos estudiados en dicha tabla.

Tabla 10. Correlación entre AL y anticuerpos antifosfolípidos (incluidos en los criterios Sidney) y nuevos autoanticuerpos.

		AL		<i>p</i>
		-	+	
ACA	-	10 (25%)	6 (14,6%)	0,276
	+	30 (75%)	35 (85,4%)	
aB2GP-I	-	9 (22,5%)	11 (26,8%)	0,798
	+	31 (77,5%)	30 (73,2%)	
AntiPS/PT IgG	-	34 (85%)	35 (85,4%)	1
	+	6 (15%)	6 (14,6%)	
AntiPS/PT IgM	-	27 (67,5%)	27 (65,9%)	1
	+	13 (32,5%)	14 (34,1%)	
aB2GP-I IgA	-	35 (87,5%)	35 (85,4%)	1
	+	5 (12,5%)	6 (14,6%)	
ACA IgA	-	38 (95%)	41 (100%)	0,241
	+	2 (5%)	0	

ACA, anticuerpo anticardiolipina; aB2GP-I, anti-β2-glicoproteína 1; AL, anticoagulante lúpico; aPSPT, anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina, IgG, inmunoglobulina G; IgM inmunoglobulina M; IgA, inmunoglobulina A.

Discusión

El estudio de los nuevos autoanticuerpos no incluidos en los criterios diagnósticos del SAF, es el objetivo principal de este trabajo.

Se determinó la frecuencia de los nuevos autoanticuerpos (anti-fosfatidilserina/antiprotrombina IgG e IgM, anticardiolipina IgA y anti-β2-glicoproteína IgA) en los distintos grupos a estudio (SAF primario, serología aPL positiva y LES). Del total de pacientes estudiados (n=173), 12,7% fueron positivos para aPSPT IgG, 32,4%

para aPSPT IgM, 1,2% para ACA IgA y 8,7% para aB2GPI IgA. No encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

El anticuerpo con mayor prevalencia es aPSPT IgM, siendo este mayor en el grupo serología aPL positiva (38,3%). Los anticuerpos ACA y aB2GPI IgA tienen una prevalencia mucho menor, no determinándose ni un solo anticuerpo ACA IgA positivo en el grupo LES. Con esto podríamos concluir, sino fuera porque la muestra de pacientes positivos para dicho anticuerpo es muy pequeña, que quizás estos anticuerpos no tienen valor diagnóstico en los pacientes SAF secundario, es decir, que padecen una conectivopatía de base como es en este caso el LES.

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica en la cual se recopilaron los artículos en los que previamente se había estudiado la frecuencia de dichos anticuerpos (Ver "Anexo II"). Las tablas se han redactado en función del autor, número de pacientes de la muestra, patología que padecen, prevalencia de los nuevos anticuerpos y su asociación o no con la clínica del SAF.

IgA anticardiolipina ha sido estudiada en LES y SAF. La prevalencia del anticuerpo en ambos grupos varía desde cero hasta cerca de la mitad de la población a estudio en los distintos estudios.

Esto se explica porque la técnica ELISA utilizada para la detección del anticuerpo anticardiolipina, ha cambiado. Antes de 1998 no se utilizaba en el diluyente de la muestra suplementos con suero fetal bovino, el cual es una fuente de B2GPI muy importante y necesaria para la detección del anticuerpo. Esto significa que durante muchos años la positividad para ACA podía ser secundaria a una causa infecciosa, obteniéndose por lo tanto falsos positivos. Cuando el suero fue incorporado la sensibilidad de la técnica disminuyó, aumentando así la especificidad de esta.

Algunos estudios han sido capaces de identificar una asociación entre ACA IgA y las manifestaciones típicas del SAF como trombosis y pérdida fetal. También se han encontrado asociaciones con patología no incluidas en los criterios definitorios de SAF como trombocitopenia, anemia hemolítica, hipertensión pulmonar, úlceras cutáneas, vasculitis, disfunción cognitiva, *livedo reticularis* y fenómeno de Raynaud.

Alarcon *et al.*, Sebastiani *et al.* y Shen *et al.*, son los estudios en los que mayor muestra de pacientes LES se han analizado y que por tanto tienen mayor representatividad. Las frecuencias para ACA IgA son 16,6%, 13,9% y 5,5% respectivamente. Como se dijo anteriormente, en el presente estudio, a pesar de la bibliografía, no se detectan anticuerpos ACA IgA en los pacientes LES.

Según la bibliografía en cuanto anti-B2GPI IgA, parece ser el isotipo prevalente y estar asociado con eventos trombóticos en pacientes con LES, haciéndolo un test relevante en este grupo de pacientes.

Sin embargo, hay que destacar que la prevalencia de IgA Anti-β2GPI podría haber sido de alguna manera sobrestimada por los problemas técnicos en la medición de los anticuerpos IgA. De hecho, una serie de investigadores con experiencia en medir los anticuerpos IgA han encontrado que la calidad y especificidad de los productos

reactivos para los anticuerpos IgA (por ejemplo, conjugado con fosfatasa anti-IgA humana) es variable.

Algunos de estos reactivos pueden reaccionar de forma cruzada con IgG y/o IgM. Por tanto, para los ensayos de IgA, suelen ser necesarios reactivos costosos que son específicos de la cadena alfa y que hayan sido adsorbidos contra IgG, IgM y otros sueros y proteínas, y/o reactivos monoclonales.

En nuestro estudio 11,4% de los pacientes LES dieron positivo para este anticuerpo. No hay mucha diferencia con los pacientes SAF primario (10,5% del total de positivos) pero sí que se observa que hay menos positivos en el grupo de serología aPL positiva (5%).

IgA anti- β 2GPI se ha descrito que está clínicamente asociado con trombosis y otras manifestaciones de SAF no incluidas en los criterios (trombocitopenia, hipertensión y fibrosis pulmonar...). Además, la presencia de anti-B2GPI IgA se ha descrito como un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (infarto agudo de miocardio, isquemia cerebral aguda, aterosclerosis).

Los anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protombina (aPSPT IgM e IgG) son los que mayor frecuencia de positivos han mostrado en nuestra cohorte.

Existen varios estudios sobre la prevalencia de los aPT en pacientes con aPL. Arvieux *et al.* encontraron una prevalencia del 55,4 % en pacientes con un resultado positivo para el AL. Galli y *et al.* hallaron aPT en el 58 % de los pacientes con SAF. Horbach *et al.* investigaron la importancia clínica de los aPT en 175 pacientes con LES y descubrieron que tanto la IgG aPT como la IgM aPT son más frecuentes en pacientes con una historia de trombosis y están relacionados con la trombosis venosa, no con la trombosis arterial. Los títulos de IgM aPT fueron ligeramente más altos en los pacientes con trombosis que en los que no estaban afectados de trombosis, mientras que los títulos de IgG aPT no mostraron diferencias entre los dos grupos.

Vaarala *et al.* determinaron un valor predictivo 2,5 veces mayor con respecto al riesgo de infarto de miocardio o muerte cardíaca en varones de mediana edad con niveles elevados de aPT. Por el contrario, Pengo *et al.* no encontraron correlación entre la presencia de aPT y trombosis en 22 pacientes con aPL y una historia de al menos un evento tromboembólico.

A la hora de estudiar si los nuevos autoanticuerpos aportan un valor adicional a la caracterización del SAF, de los 173 pacientes a los que se les determinó, los dividimos en función de si presentaban clínica trombótica u obstétrica.

En cuanto a la clínica trombótica, ningún paciente presentaba anticuerpos anticardiolipina IgA. Muy pocos pacientes dieron positivo para IgA antiB2GPI (6 pacientes, 11.1%), y como ya se mencionó antes los aPSPT IgM siguen siendo los que mayor prevalencia tienen incluso discerniendo los grupos en función de la clínica. En total 27 pacientes de los 44 que presentaban clínica trombótica, presentan alguno de los nuevos autoanticuerpos, observándose que la mayor prevalencia siempre está en el grupo SAF primario.

Cuando se compararon con los anticuerpos clásicos ninguno de los anticuerpos nuevos presenta una ventaja adicional en la identificación de los pacientes con clínica trombótica.

En cuanto a la clínica obstétrica, al igual que en la trombótica el mayor porcentaje de anticuerpos positivos reside en aPSPT IgM (26,7%), sin embargo, a diferencia de lo descrito anteriormente esta vez el grupo que obtiene mayor porcentaje de positivos es SAF+LES. Por lo tanto, para la clínica obstétrica aPSPT IgG e IgM pueden tener una importancia adicional. Esto se confirma también en las tablas de comparación con los anticuerpos clásicos, en las cuales vemos que estos anticuerpos sí que podrían tener un valor diagnóstico en los pacientes que tienen AL negativo ya que casi el 100% de los pacientes que han dado positivo para aPSPT IgM e IgG son negativos para AL.

En cuanto a los anticuerpos IgA (ACA y aB2GPI) no se obtiene ningún resultado positivo en el grupo SAF+LES, estando todos ellos en el SAF primario.

El último objetivo del estudio consistía en valorar el impacto del uso de los anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protombina (PS/PT), en lugar del anticoagulante lúpico, como sustituto en el seguimiento de los pacientes SAF en tratamiento anticoagulante.

Sabemos que el AL se une a varias proteínas plasmáticas, como la β 2GPI y la protrombina. En 1995, Arvieux *et al.* detectaron aPT (anticuerpos antiprotrombina) mediante ELISA en muestras positivas para el anticoagulante lúpico (AL) utilizando placas irradiadas, de modo similar a la prueba de anti- β 2GPI. Su hipótesis establece una analogía con los anti- β 2GPI: los aPT pueden reconocer epítomos crípticos o neoepítomos formados cuando la protrombina interactúa con la superficie aniónica.

La relación entre el aPT y el AL ha sido estudiada extensamente. En 1988, Fleck y cols. descubrieron que el aPT tenía actividad de AL. Además, Bevers y cols. demostraron que la protrombina era necesaria para la expresión de la actividad del AL en 11 de 16 muestras de plasma positivas para el AL y carentes de anticardiolipina, lo que implica que al menos el 69 % de la actividad del AL, depende de los anticuerpos que unen la protrombina.

En nuestro estudio, de los 81 pacientes en los que se determinó el anticoagulante lúpico, 41 dieron positivo. A estos pacientes se les determinó los anticuerpos antifosfatidilserina/protombina IgG e IgM con la finalidad de averiguar cuantos de los que son positivos para estos, lo son al mismo tiempo para el AL. Un 48,7% de los pacientes son positivos al mismo tiempo para aPSPT IgG e IgM y AL, casi la mitad de la cohorte estudiada, pero no se hayan diferencias significativas por lo que no parece muy acertado usarlo de manera indiscriminada como alternativa al anticoagulante lúpico en los pacientes que están en tratamiento anticoagulante.

Las principales limitaciones de nuestro estudio han sido la cohorte relativamente corta de pacientes, especialmente en el grupo LES+SAF (n=22) y la falta de un grupo control con individuos sanos. Además, cuenta con las limitaciones inherentes a todo estudio de carácter retrospectivo.

Lo ideal sería el estudio en población seronegativa, pero esta es una población difícil de caracterizar y además, muchos pacientes se pierden en el seguimiento ya que no se les remite al Servicio de Reumatología porque muchos médicos de atención primaria tras la sospecha de un SAF y la realización de los aPL, por mucha clínica sugestiva de la enfermedad que tengan si los anticuerpos son negativos no se considerará que tengan la enfermedad.

Por otra parte, consideramos que el presente estudio tiene algunos puntos fuertes entre los que destaca que se trata de una serie de pacientes bien caracterizada y seguida, de acuerdo a unos criterios homogéneos, por un único investigador.

De cara al futuro, lo ideal sería la inclusión de un grupo control pareado para edad y sexo. Incluir el resto de la cohorte SAF del Servicio de Reumatología del HUMV (n=81) y determinar los nuevos autoanticuerpos en pacientes con posible SAF seronegativo trombótico y con abortos de repetición sin causa aparente.

Conclusiones

1. La frecuencia de los nuevos autoanticuerpos estudiados en el presente trabajo es similar a la descrita en la literatura reciente, salvo los anticuerpos IgA.
2. Los resultados de este trabajo no apoyan el uso indiscriminado de los nuevos autoanticuerpos en pacientes con sospecha de SAF.
 - a. Más de la mitad de los pacientes con clínica trombótica fueron positivos para alguno de los nuevos aPL estudiados, sobre todo, aPSPT, aunque ninguno parece aportar significación clínica respecto a los aPL establecidos en los criterios.
 - b. Los aPSPT de clase IgM fueron los más prevalentes en la clínica obstétrica, sobre todo en los pacientes con LES y SAF secundario.
3. Los anticuerpos anti-fosfatidilserina/antiprotrombina no parece que tengan una especial utilidad en el seguimiento de pacientes AL positivo anticoagulados, debido a su baja frecuencia.

Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias a Germán Daroca Bengoa, Silvia García Canale y Maite Cuberia Palenzuela por permitirme trabajar sobre la base de datos confeccionada por ellos. A Juan Cantos Mansilla por su ayuda en la elaboración de la técnica ELISA en el laboratorio de Inmunología, y a Leyre Riancho Zarrabeitia por su ayuda con el análisis estadístico.

Bibliografía

1. Wendy Lim. Antiphospholipid syndrome. American society of Hematology. Hematology 2013. Updates in aggressive thrombotic disease: 675 – 680.
2. Cloé Comarmond, Patrice Cacoub. Antiphospholipid syndrome: from pathogenesis to novel immunomodulatory therapies. Elsevier. Autoimmunity Reviews 2013 (12): 752-757.
3. Jose A. Gómez-Puerta, Ricard Cervera. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. Elsevier. Autoimmunity Reviews 2013 (48-49): 20-25.
4. Raquel Ruiz-García, Manuel Serrano, José Ángel Martínez-Flores, Sergio Mora, Luis Morillas, María Ángeles Martín-Mola, et al. Isolated IgA Anti- β 2 Glycoprotein I Antibodies in Patients with Clinical Criteria for Antiphospholipid Syndrome. Journal of Immunology Research. 2014, Article ID 704395, 8 pages.
5. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. Lancet. 2010 Oct 30;376(9751):1498-509.
6. Douglas A. Triplett, MD. Antiphospholipid Antibodies. Arch Pathol Lab Med. 2002; 126: 1424 -1429.
7. Martinez-Berriotxo A, Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV et al. Transiently positive anticardiolipin antibodies and risk of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(10):810-6.
8. Coloma Bazán E, Donate López C, Moreno Lozano P, Cervera R, Espinosa G. Discontinuation of anticoagulation or antiaggregation treatment may be safe in patients with primary antiphospholipid syndrome when antiphospholipid antibodies became persistently negative. *Immunol Res*. 2013 Jul;56(2-3):358-61.
9. Fabrizio Conti, Antonella Capozzi, Simona Truglia, Emanuela Lococo, Agostina Longo, Roberta Misasi, et al. The Mosaic of “Seronegative” Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Immunology Research*. 2014, Article ID 389601, 7 pages.
11. 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.
12. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009 Oct;7(10):1737-40.

13. Varun Dhir, Benzeeta Pinto. Antiphospholipid syndrome: a review. *Journal of Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences*. 2014 (19): 9-28.
14. Rabih Nayfe, Imad Uthman, Jessica Aoun, Ehab Saad Aldin, Mira Merashli, Munther A. Khamashta. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* 2013. Review.52:1358-1367.
15. Andreoli L1, Fredi M, Nalli C, Piantoni S, Reggia R, Dall'Ara F, Franceschini F, Tincani A. Clinical significance of IgA anti-cardiolipin and IgA anti- β 2glycoprotein I antibodies. Springer. *Curr Rheumatol Rep*. 2013 Jul;15:343.
16. Hector Meijide, Savino Sciascia, Giovanni Sanna, Munther A. Khamashta, María Laura Bertolaccini. The clinical relevance of IgA anticardiolipin and IgA anti- β 2 glycoprotein I antiphospholipid antibodies: a systematic review. *Elsevier. Autoimmunity Reviews* 12 (2013) 421-425.
17. Veronica Rodríguez-García, Yiannis Ioannou, Antonio Fernández-Nebro, David A. Isenberg and Ian P.Giles. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid síndrome: a systematic review. *Rheumatology Advance Acces* published July 7, 2015. 10.1093.
18. Olga Amengual, Tatsuya Atsumi, Takao Koike. Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003 Apr;48(4):886-95.

Anexo I - Criterios diagnósticos del síndrome antifosfolípido¹⁰

Para el diagnóstico de SAF se requieren al menos un criterio clínico y uno de laboratorio.

Criterios clínicos

- Trombosis vascular: uno o más episodios de trombosis arterial, venosa o de pequeño vaso en cualquier órgano o tejido del organismo, confirmado por pruebas de imagen apropiadas y/o análisis histopatológico.
- Morbilidad durante el embarazo:
 - Uno o más abortos de un feto morfológicamente normal de al menos 10 semanas de gestación, con morfología normal del feto documentada mediante ultrasonografía o examen directo del feto.
 - Uno o más partos prematuros de un neonato morfológicamente normal antes de la semana 34 de gestación debido a: a) eclampsia o pre-eclampsia severa o b) insuficiencia placentaria.
 - Tres o más abortos espontáneos consecutivos antes de la semana 10 de gestación, habiendo descartado anomalías anatómicas u hormonales de la madre y anomalías cromosómicas tanto maternas como paternas.

Criterios de laboratorio*

- Anticoagulante lúpico (AL), determinado de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (Subcomité científico de anticoagulante lúpico/anticuerpos antifosfolípido).
- Anticuerpos anticardiolipina (ACL) tipo IgG y/o IgM medidos por ELISA, a títulos medios o elevados (> 40 GPL o MPL, ó > percentil 99).
- Anticuerpos anti β 2-glicoproteína I tipo IgG y/o IgM medidos por ELISA, a títulos > percentil 99.

*Para considerar el diagnóstico de síndrome antifosfolípido se deben obtener resultados positivos en suero o plasma, al menos en dos ocasiones, con un tiempo de 12 semanas entre las determinaciones.

Anexo II. Resumen de los hallazgos publicados sobre la prevalencia de los nuevos autoanticuerpos.

Prevalencia de IgA anticardiolipina en pacientes con enfermedades autoinmunes (en particular LES y SAF)

Autor	n	Patología población	Prevalencia Ac (%)	Clínica asociada a IgA ACL
Gharavi et al., 1987	40	Anticuerpos antifosfolípidos positivos	52,5	Ninguna
Weidmann et al., 1988	92	LES	44	Enfermedad renal, uso de fármacos alquilantes
Kalunian et al., 1988	85	LES	27,1	Trombosis arterial, trombosis venosa, pérdida fetal
Alarcon et al., 1989	500	LES	16,6	Trombocitopenia. Hipertensión pulmonar, anemia hemolítica
Wong et al., 1991	91	LES	4,4	Ninguna
Loizou (1992)	200	Pacientes con anticuerpos antifosfolípido positivo	21	No descrito
Merkel et al., 1996	70	LES	0	No descrito
	33	SAF	15,2	No descrito

Molina et al., 1997	163	LES	14,1	Anemia hemolítica, PTT prolongado y falsos positivos en los tests VDRL
Selva et al., 1997	255	SAF	0,8	No descrito
Molina et al., 1997	152	LES	13,8	Ninguna
Molina et al., 1997	136	LES	20,6	Ninguna
Tajima et al., 1998	77	SAF con anticuerpos antifosfolípido positivos	42,9	Trombocitopenia, vasculitis, úlceras cutáneas,
Fanopoulos et al., 1998	48	LES	2	No descrito
Tajima et al., 1998	77	Enfermedad del tejido conectivo	61	Trombocitopenia, úlceras cutáneas sin relación con el anticuerpo a estudio
Cucurull et al., 1999	100	LES	34	Trombosis
Hanly et al., 1999	51	LES	16-28	Disfunción cognitiva

Sebastiani et al., 1999	574	LES	13,9	Livedo reticularis, fenómeno de raynaud
Lakos et al., 1999	33	SAF	78	Trombocitopenia, enfermedad valvular cardíaca, epilepsia, livedo reticularis
	37	LES	38	Trombosis venosa profunda
Diri et al., 1999	8	SAF	87	Ictus/AIT, Mielitis transversa
Lakos et al., 1999	33	SAF	78	No descrito
	37	LES	38	No descrito
Cucurull et al., 1999	100	LES	24	Trombosis sin relación con el anticuepo a estudio
Greco et al., 2000	118	Anticuerpos anticardiolipina positivos	12,7	No descrito
	73	No Anticuerpos anticardiolipina	12	Trombosis, perdida fetal recurrente
Spadaro et al., 2000	65	LES	20	No descrito
Shrivastava et al., 2001	76	LES	5,3	No descrito

Bertolaccini et al., 2001	134	LES	13,4	Ninguna
Lee RM et al., 2001	67	Síndrome antifosfolípido primario obstétrico	16	No descrito
Carmo-Pereira et al., 2003	28	Síndrome antifosfolípido primario	42,8	No descrito
	28	LES	50	No descrito
Samarkos et al., 2006	130	LES	8,5	Trombosis venosa, trombocitopenia, pérdida fetal
	35	Síndrome antifosfolípido primario	40	
Shen et al., 2008	472	Pacientes positivos para anticuerpos antifosfolípido	5,5	Trombosis
Mehrani et al., 2011	796	LES	8,5	No descrito

Veronica Rodríguez-García et al., 2015	229	SAF	20,9	No descrito
--	-----	-----	------	-------------

SAF, síndrome antifosfolípido; LES, lupus eritematoso sistémico; PTT, tiempo parcial de tromboplastina.

Prevalencia de IgA antiB2glicoproteína I en pacientes con enfermedades autoinmunes (en particular LES y SAF)

Autor	n	Patología población	Prevalencia Ac (%)	Clínica asociada a IgA B2GPI I
Fanopoulos et al., 1998	48	LES	58	Manifestaciones clínicas del SAF (trombosis, pérdidas fetales)
Tsutsumi et al., 1998	124	LES	25	Trombosis, anticoagulante lúpico
Lewis et al., 1998	43	SAF	74	No descrito
Cucurull et al., 1999	100	LES	19	Trombosis
Lakos et al., 1999	33	SAF	49,4	Trombosis venosa, trombocitopenia, enfermedad de la válvula cardíaca, epilepsia, livedo reticularis
	37	LES	16,2	No descrito
Guerin et al., 1999	17	SAF	47	Ninguna
	70	LES ±SAF	13	Ninguna
Greco et al., 2000	118	Anticuerpos anticardiolipina positivos	35,6	Manifestaciones clínicas del SAF (trombosis, pérdidas fetales)

	73	Anticuerpos anticardiolipina negativos	27,4	Trombosis, pérdida fetal recurrente
Bruce et al., 2000	133	LES	10,5	Ninguna
Lee RM et al., 2001	67	Síndrome antifosfolípido primario obstetrico	72	Pérdida fetal
Lee SS et al., 2001	270	LES	34,8	Trombosis
Bertolaccini ML et al., 2001	134	LES	13	IgA ACL no son de ayuda en el reconocimiento de SAF en LES
Carmo-Pereira et al., 2003	28	Síndrome antifosfolípido primario	3,5	No descrito
	130	LES	3,5	No descrito
Danowski et al., 2006	418	Síndrome antifosfolípido primario, LES ± SAF, LES± Anticuerpos antifosfolípido positivos	22,2	Trombosis
Samarkos et al., 2006	130	LES	17,7	Ninguna
	35	SAF primario	25,7	Ninguna
Gabeta et al., 2008	192	ND	33	Hepatitis autoinmune

Shen et al., 2008	472	Pacientes testados de continuo los anticuerpos antifosfolípido	19,2	Trombosis
Karpouzas et al., 2009	178	LES	13,6	Trombosis
Kumar et al., 2009	5	LES	100	Morbilidad del embarazo, úlceras cutáneas
Sweiss et al., 2010	56	Pacientes positivos únicamente para IgA B2GPI (31 con LES) vs. Controles	100	Trombosis, Enfermedad del sistema inmune de la mucosa, principalmente sistema gastrointestinal / pulmonar y piel
Mehrani et al., 2011	796	LES	20,2	Trombosis venosa, trombocitopenia, hipertensión y fibrosis pulmonar, alta velocidad de sedimentación eritrocitaria, complemento (C3) bajo, anticuerpos antiSM
Mankai et al., 2011	63	Enfermedad celíaca	14,3	Diagnóstico de enfermedad celíaca
Holc et al., 2011	68	Artritis reumatoide	29,4	Aterosclerosis
Veronica Rodríguez-García et al., 2015	229	SAF	56.3	No descrito

SAF, síndrome antifosfolípido; LES, lupus eritematoso sistémico; B2GPI, anticuerpo anti β 2 glicoproteína; ACL, anticuerpos anticardiolipina; ND, no datos

Prevalencia de anticuerpos de clase IgG e IgM frente al complejo fosfatidilserina/protrombina (PS/PT) en pacientes con condiciones autoinmunes (en particular LES y SAF)

Autor	n	Población	Prevalencia Ac (%)	Clínica asociada Ac
Arvieux J, et al., 1995	139	Pacientes positivos para el AL	55,4%	No descrito
Vaarala O, et al., 1996	106	IAM	ND	aPT como nuevo predictor inmunológico de IAM
	106	Sin episodios coronarios		
Horbach et al., 1996	175	LES	38 % (IgG) 18 % (IgM)	Trombosis venosa
Pengo et al., 1996	22	aPL positivos	50%	No correlación con trombosis
Puurunen et al., 1996	110	LES	34%	TVP
D'Angelo et al., 1996	139	Sospecha de clínica de enfermedad autoinmune	51	No correlación con trombosis
Forastiero et al., 1997	233	aPL positivos	26	No correlación con trombosis
Galli et al., 1997	59	aPL positivos	58%	No correlación con trombosis
Swadzba et al., 1998	127	LES	28% (IgG) 29% (IgM)	No correlación con trombosis
Bertolaccini et al., 1998	207	LES	28%	Trombosis
Guerin et al., 1998	295	Enfermedades autoinmunes	59%	No correlación con trombosis, correlación con SAF
Inanç et al., 1998	57	LES	43%	No correlación con trombosis

Sorice et al., 1998	59	LES, SAF primario	25%	Manifestaciones clínicas de SAF
Lakos et al., 2000	70	Enfermedades autoinmunes	33%	Trombosis
Muñoz-Rodríguez et al., 2000	177	LES, SAF primario	47%	Trombosis arterial, trombocitopenia
Nojima et al., 2001	124	LES	52%	Trombosis venosa

AL, anticoagulante lúpico; IAM, infarto de miocardio; aPT, anticuerpos antifosfolípido; ND, no datos; LES, lupus eritematoso sistémico; TVP, trombosis venosa profunda; SAF, síndrome antifosfolípido.

