

Características biológicas del síndrome antifosfolípido en pacientes con accidente cerebrovascular

J.L. Romero Barbero¹, P. Rubio García², P. Moreno del Castillo¹, A. Cáceres Sansaloni¹, L. Cuéllar Cariñanos¹, M^a. T. Llorente Ballesteros²

Resumen

El objetivo del presente estudio es observar la frecuencia de aparición de los anticuerpos contra los fosfolípidos en pacientes con accidente cerebrovascular y su distribución.

Se estudian 640 muestras de pacientes con diagnóstico previo de accidente cerebrovascular para la detección de anticuerpos contra los fosfolípidos (anticoagulante lúpico y anticuerpos reactivos con la cardiolipina). La detección de anticuerpos reactivos con la cardiolipina se realiza mediante enzoinmunoanálisis. La presencia de anticoagulante lúpico se detecta mediante los tiempos de tromboplastina parcial activada, tiempo del veneno de víbora de Russell diluido y la inhibición del tiempo de tromboplastina diluida, sin medir magnitudes confirmatorias. Tras un periodo de 2 meses se realiza un nuevo estudio al paciente.

Un 10,8% de los pacientes estudiados presentaban anticuerpos contra los fosfolípidos en sangre siendo los anticuerpos reactivos con la cardiolipina la alteración más común. La coexistencia de anticuerpo lúpico y anticuerpos reactivos con la cardiolipina es muy infrecuente lo que hace imprescindible la búsqueda de ambas magnitudes en el estudio de pacientes con accidente cerebrovascular.

Introducción

Se denomina síndrome antifosfolípido la presencia en sangre de anticuerpos contra los fosfolípidos asociados a fenómenos trombóticos, tanto arteriales como venosos, pérdida fetal recurrente o trombocitopenia (1). Esta entidad clínica fue inicialmente descrita en el lupus eritematoso sistémico, aunque también se detecta en otras enfermedades de tipo autoinmune, enfermedades infecciosas, procesos neoplásicos, e incluso en personas aparentemente sanas (2,3). El uso prolongado de ciertas drogas como clorpromacina, quinidina o quinina también se ha relacionado con la positividad a anticuerpos contra los fosfolípidos (4). El síndrome antifosfolípido no asociado a otras condiciones clínicas se denomina primario, mientras que el secundario se presenta junto con otras patologías, principalmente el lupus eritematoso sistémico (5).

Summary

The aim of this study is to observe the frequency of appearance of antiphospholipid antibodies on patients with cerebral ischaemia and their distribution.

640 samples from patients with previous diagnosis of cerebral ischaemia are studied to detect antiphospholipid antibodies (lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies). The anticardiolipin antibodies detection is done by enzyme-linked immunosorbent assay. The presence of lupus anticoagulant is detected through activated partial thromboplastin time, dilute Russell's viper venom time and thromboplastin inhibition test, without carrying out confirmatory test. Two months later a new study is carried out on the patient.

10,8% of the patients showed antiphospholipid antibodies, being the anticardiolipin antibodies the most common alteration.

The coexistence of both lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies is very infrequent which makes the search of both essential.

La expresión biológica de los anticuerpos contra los fosfolípidos son el anticoagulante lúpico y los anticuerpos reactivos con la cardiolipina (6). Se trata de un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas de los subtipos IgG, IgM e IgA con afinidad por los complejos de fosfolípidos y proteínas de las membranas celulares en los que las proteínas principalmente implicadas son protrombina, proteína C, proteína S y β 2-glicoproteína I (7). Esta última actúa como cofactor en la unión de la cardiolipina y sus anticuerpos específicos. Se ha demostrado que la IgG purificada de pacientes con anticuerpos reactivos con la cardiolipina no se fija a la cardiolipina si la β 2-glicoproteína I no se encuentra presente (8). Sin embargo, esto no ocurre así cuando los anticuerpos contra los fosfolípidos aparecen asociados a un proceso infeccioso, y en este caso la unión de los anticuerpos reactivos con la cardiolipina-cardiolipina es independiente de la β 2-glicoproteína I (9).

Se ha señalado también la importancia de la protrombina como cofactor para el anticoagulante lúpico (10,11). De igual manera que para la β 2-glicoproteína I, esta actividad de la protrombina como cofactor del anticoagulante lúpico parece no ser relevante en pacientes con anticuerpos contra los fosfolípidos asociados a infección o a procesos neoplásicos (12).

El objetivo del estudio es revisar la prevalencia de la aparición de los anticuerpos contra los fosfolípidos, en una serie

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia.

²Servicio de Análisis Clínicos.

Hospital Militar Central Gómez Ulla, Madrid.

Recibido: 22-12-98

Aceptado: 11-8-99

consecutiva de pacientes ingresados por un primer episodio de accidente cerebrovascular.

Material y métodos

Pacientes

Se estudian, desde el año 1993, 640 muestras de pacientes no seleccionados remitidos por el Servicio de Neurología, con diagnóstico de accidente cerebrovascular; 353 varones con edades entre 19-91 años y 287 mujeres entre 22-100 años. Todas las muestras se obtuvieron una vez confirmado el diagnóstico y antes de la instauración del tratamiento anticoagulante y/o antiagregante.

Obtención, preparación y conservación de las muestras
El plasma se obtuvo mediante centrifugación a $2000 \times g$ durante 15 minutos de la sangre recogida en citrato sódico al 3,8% en proporción 1/10, y posterior separación evitando la capa leucopláquetar. Para su conservación se almacenó congelado a -20°C .

Detección de anticoagulante lúpico y anticuerpos reactivos con la cardiolipina

Para poner de manifiesto la presencia del anticoagulante lúpico se utilizaron tiempos de coagulación dependientes de fosfolípidos como el tiempo de tromboplastina parcial activada, el tiempo del veneno de víbora de Russell diluido y la inhibición del tiempo de tromboplastina diluida al 1:1000, considerándose la alteración de los tiempos a partir de un cociente muestra/control superior a 1,25 para el tiempo de tromboplastina parcial activada, superior a 1,2 para el tiempo del veneno de víbora de Russell diluido y superior a 1,3 para la inhibición del tiempo de tromboplastina diluida según Rosner et al (13).

En aquellas muestras en las que alguna de estas magnitudes resultó alterada se realizó una prueba de mezclas para descartar un déficit factorial o un anticoagulante factorial. El criterio de positividad utilizado fue la alteración de al menos 2 de las 3 magnitudes. En ninguna muestra se realizó la prueba de confirmación mediante neutralización de plaquetas o elevada concentración de lípidos. Los anticuerpos reactivos con la cardiolipina se detectaron mediante enzoinmunoanálisis.

Instrumentación y reactivos

Los procedimientos coagulométricos se realizaron en un analizador STA (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) y el enzoinmunoanálisis se realizó en los sistemas Autoplate y Gest (Menarini Diagnostics, Italia).

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tiempo de tromboplastina parcial activada: STA APTT LT (Boehringer Mannheim, ref. 1 776 878).
- Inhibición del tiempo de tromboplastina diluida al 1:1000: STA Neoplastin®Plus (Boehringer Mannheim, ref. 1 447 205).
- Tiempo del veneno de víbora de Russell diluido: DVV TEST® (American Diagnostica Inc, Greenwich, Inglaterra; ref. 810).
- Anticuerpos reactivos con la cardiolipina (Chesire Diagnostics Limited, Chester, Inglaterra; ref. 4201). En nuestro laboratorio se ha considerado el límite superior de referencia en 18 unidades GPL/mL (ó karb.u./L) (Estándar Internacional de anticuerpos reactivos con la cardiolipina, IgG) para los anticuerpos del tipo IgG y 12 unidades MPL/mL (ó karb.u./L) (Estándar Internacional de anticuerpos reactivos con la cardiolipina, IgM) para los anticuerpos

del tipo IgM, definidos éstos como la actividad de unión a la cardiolipina de $1 \mu\text{g/mL}$ de los anticuerpos reactivos con la cardiolipina del tipo IgG ó IgM respectivamente, purificado por afinidad a partir de un suero estándar (14).

Resultados

Del total de muestras analizadas obtuvimos resultados positivos para anticuerpos contra los fosfolípidos en 69 pacientes. En estos resultados no se tienen en cuenta los pacientes que se negativizaron después de un periodo de 2 meses.

En las tablas I a IV se presenta la distribución total de los resultados, diferenciando por tipo de anticuerpo, por sexo y por isotipo de anticuerpo.

Tabla I. Distribución del total de resultados

	Muestras	Casos positivos	Prevalencia (%)
Total	640	69	10,8
Varones	353	42	11,9
Mujeres	287	27	9,4

Tabla II. Distribución por anticuerpos

	n	AL*		AAC**		AL+AAC	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Varones	42	12	28,6	22	52,4	8	19,0
Mujeres	27	6	22,2	19	70,3	2	7,4
Total	69	18	26,1	41	59,4	10	14,5

*AL: anticoagulante lúpico, **AAC: anticuerpos reactivos con la cardiolipina

Tabla III. Distribución por isotipo de anticuerpos reactivos con la cardiolipina

	n	IgG		IgM		IgG+IgM	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Varones	22	17	77,3	4	18,2	1	4,5
Mujeres	19	14	73,7	4	21,1	1	5,1
Total	41	31	75,6	4	19,5	2	4,9

Tabla IV. Asociación de anticoagulante lúpico y anticuerpos reactivos con la cardiolipina por isotipos

	AL*+AAC** _{IgG}			AL+AAC _{IgM}		AL+AAC _{IgG+IgM}	
	n	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Varones	8	3	37,5	3	37,5	2	25,0
Mujeres	2	1	50,0	1	50,0	0	-
Total	10	4	40,0	4	40,0	2	20,0

*AL: anticoagulante lúpico, **AAC: anticuerpos reactivos con la cardiolipina

Discusión

Los resultados muestran una prevalencia de anticuerpos contra los fosfolípidos en un 10,8% de los casos de accidente cerebrovascular. Mientras que estudios semejantes de otros autores muestran una prevalencia inferior (15), cuando se estudian grupos de menor edad la prevalencia alcanza valores de hasta el 18% (16).

En cuanto a la distribución por anticuerpos la alteración más común es la presencia de anticuerpos reactivos con la cardiolipina que aparece en un 59,4 % de los pacientes con anticuerpos contra los fosfolípidos en sangre, mientras que la del anticoagulante lúpico fue de un 26,1%. El isotipo de anticuerpos reactivos con la cardiolipina que se detecta con mayor frecuencia es IgG-anticardiolipina, dato similar al obtenido por otros autores (17).

Algunos estudios relacionan la presencia del isotipo IgG-anticardiolipina a concentraciones arbitrarias moderadas y elevadas, con un riesgo mayor de presentar episodios trombóticos a edades tempranas, mientras que el isotipo IgM no parece influir en el riesgo (18). Las concentraciones arbitrarias elevadas de IgG-anticardiolipina tienen mayor incidencia en mujeres y en sujetos jóvenes y están asociados a un mayor riesgo de recurrencias por lo que esta determinación podría tener valor pronóstico (19).

La coexistencia de anticoagulante lúpico y anticuerpos reactivos con la cardiolipina aparece sólo en el 14% de las muestras de pacientes con anticuerpos contra los fosfolípidos, con un número significativamente mayor para los varones que para las mujeres. Esta baja asociación demuestra que la selección no se puede reducir a la búsqueda de anticoagulante lúpico o anticuerpos reactivos con la cardiolipina puesto que la ausencia de uno de ellos no descarta la presencia de anticuerpos contra los fosfolípidos.

Como hemos señalado, en nuestro laboratorio no se realizaron pruebas de confirmación, considerando suficiente la alteración de al menos 2 de las 3 magnitudes mencionadas (tiempo de tromboplastina parcial activada, veneno de víbora de Russell diluido, inhibición del tiempo de tromboplastina diluida al 1:1000) con repetición a los 2 meses para demostrar la presencia de anticoagulante lúpico en sangre.

Correspondencia:
P. Moreno del Castillo,
Servicio de Hematología y Hemoterapia,
Hospital Militar Central Gómez Ulla,
Glorieta del Ejército s/n,
28025. Madrid

Bibliografía

1. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342: 341-4.
2. Font J, Cervera R, Khamashta Ma. Síndrome antifosfolípido. *Medicine* 1997;7:2351-7.
3. Emlen W. Antiphospholipids antibodies: new complexities and new assays. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1441-3.
4. Bird MR, O'Neill AI, Buchanan RRC, Ibrahim NMA, Parkin D. Lupus anticoagulant in the elderly may be associated with both quinine and quinidine usage. *Pathology* 1995; 27: 136-9.
5. Irigoyen MV, Panero B, Coret V, Rodríguez M. Lupus eritematoso sistémico: alteraciones de laboratorio. *Medicine* 1997;7:2344-50.
6. Triplett DA, Brandt JT, Musgrave KA, Orr C. Relationship between lupus anticoagulant and antibodies to phospholipids. *JAMA* 1988; 259: 550-4.
7. Triplett DA. Antiphospholipids-protein antibodies: clinical use of laboratory test results (identification, predictive value, treatment). *Haemostasis*. 1996 Oct; Suppl:358-67.
8. Galli M, Comfurius P, Maassen C et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) are directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-7.
9. Mc Neil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid b2-glycoprotein I complex is an antigen for cardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992; 2: 75-81.
10. Triplett DA. Antiphospholipid-protein-antibodies: laboratory detection and clinical relevance. *Thromb Res* 1995; 78: 1-31.
11. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA. Lupus anticoagulant IgG (LA) are not directed to phospholipid only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-32.
12. Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1120-5.
13. Rosner et al. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemostas*. 1987; 57:14.
14. The Kingston Anti-Phospholipid Antibody Study (KAPS) Group. The second international Anti-Cardiolipin standardization workshop. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 476-84.
15. Montalban J, Codina A, Ordi J, Vilardell M, Khamashta MA, Hughes GRV. Antiphospholipid antibodies in cerebral ischemia. *Stroke* 1991;22:750-3.
16. Nencini P, Baruffi MC, Massai G, Amaducci L, Inzitari P. Lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in young adults with cerebral ischemia. *Stroke* 1992; 23: 189-93.
17. Vivancos J, López Soto A, Font J, Balasch J, Cervera R, Reverter J C, et al. SAF: estudio clínico y biológico de 36 casos. *Med Clin (Barc)* 1994; 102: 561-5.
18. Taknashi J, Sugita K, Miyazato S, Sakao E, Miyamoto H Niimi H. Antiphospholipid antibody syndrome in childhood strokes. *Pediatr Neurol* 1995; 13: 323-6.
19. Levine S R, Brey R L, Sawaya K L, Salowich-Palm L, Kokkinos J, Kostzema B, et al. Recurrent stroke and thrombo-occlusive events in the antiphospholipid syndrome. *Ann Neurol* 1995; 38: 119-24.