

## Síndrome antifosfolípido: mecanismos patogénicos, diagnóstico y tratamiento

Silvia S. Pierangeli<sup>1</sup>, Héctor R. Pierangeli<sup>2</sup>

**Resumen:** Los anticuerpos antifosfolípidos están asociados con trombosis y pérdidas fetales en pacientes con síndrome antifosfolípido. Se han descrito diversos mecanismos patogénicos para explicar las manifestaciones clínicas producidas por los anticuerpos. En esta revisión se discuten las modalidades corrientes para el tratamiento y se describe en detalle una actualización de las pruebas de laboratorio utilizadas para confirmar el diagnóstico de síndrome antifosfolípido. La prueba de anticuerpos anticardiolipina ha sido utilizada ampliamente por los médicos desde la mitad de los años 80 para el diagnóstico de pacientes con síndrome antifosfolípido. Establecer correctamente un diagnóstico permite manejar efectivamente pacientes con trombosis recurrentes y pérdidas fetales. La prueba de anticuerpos anticardiolipina fue establecida en 1983 como una técnica de radioinmunoensayo y fue luego convertida en un enzimoimmunoensayo (ELISA). Otra prueba utilizada comúnmente en el diagnóstico de síndrome antifosfolípido es el anticoagulante lúpico. La prueba de anticuerpos anticardiolipina por ELISA es sensible para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido pero de baja especificidad. Por otra parte, la prueba de anticoagulante lúpico, no obstante ser más específica, no es tan sensible como la prueba de anticuerpos anticardiolipina por ELISA. Se han desarrollado otras pruebas más específicas como la determinación de anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I (anti- $\beta_2$  GPI), antiprotrombina (anti-PT) y la prueba APhL por ELISA, que utiliza fosfolípidos cargados negativamente en lugar de cardiolipina como antígeno para cubrir los platos de microtitulación. Este módulo trata en detalle el valor clínico de las pruebas antes mencionadas, los problemas técnicos asociados con ellas, los criterios utilizados por el laboratorio para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido y las posibles nuevas y mejores pruebas que estarán disponibles en un futuro cercano para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido.

**Palabras clave:** anticuerpos anticardiolipina, anticuerpos antifosfolípidos, anticoagulante lúpico, anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I.

**Pierangeli SS, Pierangeli HR.** Síndrome antifosfolípido: mecanismos patogénicos, diagnóstico y tratamiento. *Medicina & Laboratorio* 2008; 14: 111-124.

Módulo 1 (La clínica y el laboratorio), número 67. Editora Médica Colombiana S.A., 2008<sup>©</sup>.

Recibido el 10 de febrero, 2008; aceptado el 25 de marzo, 2008.

**E**l síndrome antifosfolípido es una enfermedad autoinmune y multisistémica caracterizada por trombosis recurrentes, pérdidas de embarazo y trombocitopenia, asociadas con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos: anticardiolipina positiva en forma persistente y/o anticoagulante lúpico [1, 2].

1. PhD, Profesora. Directora, Antiphospholipid Standardization Laboratory, Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, University of Texas Medical Branch. 301 University Boulevard. Galveston, Texas 77555-1165, Estados Unidos. Teléfono (409) 772-0222, Fax (409) 772-0223. sspieran@utmb.edu
2. PhD. Louisville APL Diagnostics, Inc. 2622 Nasa Pkwy. Seabrook, Texas, Estados Unidos.

El síndrome antifosfolípido fue descrito por primera vez en aquellos pacientes con lupus eritematoso sistémico con una prueba de anticoagulante lúpico anormal [3]. El síndrome antifosfolípido fue clasificado como secundario en presencia de lupus eritematoso sistémico o de otras enfermedades autoinmunes, y como primario en ausencia de ellas. En la población general se ha estimado que el síndrome antifosfolípido primario es la causa más común de trombofilia adquirida y esta enfermedad es responsable del 15% al 20% de todos los episodios de trombosis venosa profunda con o sin embolismo pulmonar, de la tercera parte de los accidentes cerebrovasculares que ocurren en pacientes menores de 50 años, y del 10% al 15% de las mujeres con pérdidas fetales recurrentes [4]. Se ha estimado que del 2% al 5% de la población general ha tenido algún episodio de trombosis venosa profunda, lo que sugiere que la prevalencia de trombosis asociada con síndrome antifosfolípido puede ser alta, como del 0,3% al 1% de la población general.

Además, se sabe que en pacientes con lupus eritematoso sistémico, el síndrome antifosfolípido es responsable de una proporción significativa de enfermedad tromboembólica y de pérdidas fetales recurrentes. Los anticuerpos antifosfolípidos están presentes en un 30% a 40% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico, y de ellos una tercera parte presentan manifestaciones clínicas de síndrome antifosfolípido [5].

Actualmente está bien establecido que los anticuerpos antifosfolípidos son heterogéneos y están unidos a varias proteínas blanco "target", que incluyen, entre otras, la proteína plasmática  $\beta_2$  glicoproteína I ( $\beta_2$  GPI) y la protrombina [6, 7]. Otros targets antigénicos han sido identificados en pacientes con síndrome antifosfolípido incluyendo el activador del plasma tisular, la plasmina, la anexina A2 y la trombina, entre otras [8-10]. Por tal motivo es razonable especular que los mecanismos fisiopatológicos pueden involucrar anticuerpos dirigidos a todos esos antígenos target.

Los estudios de trombosis utilizando modelos animales, activación de células endoteliales y pérdida de embarazo han demostrado evidencia convincente de que los anticuerpos antifosfolípidos son patogénicos *in vivo* [11-14] y más de un mecanismo está relacionado con trombosis. Los estudios *in vitro* han demostrado que los anticuerpos antifosfolípidos pueden provocar trombosis por interferir con la activación de la proteína C o por la inactivación del Factor V en la activación de la proteína C, inhibiendo la producción de la prostaciclina en las células endoteliales, afectando la fibrinólisis, activando las células endoteliales y los monocitos, y ejerciendo

**Tabla 1.** Criterios para la clasificación del síndrome antifosfolípido. El diagnóstico del síndrome antifosfolípido requiere la presencia de al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio

#### Criterios clínicos

Trombosis vascular: uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos en cualquier tejido u órgano (validados objetivamente mediante estudios imagenológicos o por histopatología)

Complicaciones del embarazo:

- Una o más muertes inexplicables de fetos morfológicamente normales a las 10 semanas o más de gestación, con morfología fetal normal, o
- Uno o más nacimientos prematuros de neonatos morfológicamente normales a las 34 semanas de la gestación o antes, debido a eclampsia, preeclampsia severa o a insuficiencia placentaria severa, o
- Tres o más abortos espontáneos consecutivos inexplicables antes de la semana 10 de gestación, habiéndose excluido anomalías maternas anatómicas u hormonales, y alteraciones cromosómicas en ambos padres

#### Criterios de laboratorio

Anticoagulante lúpico en plasma, en dos o más ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas, de acuerdo con las pautas establecidas por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*)

Anticuerpos anticardiolipina IgG y/o IgM en suero o plasma con títulos medios o altos (>40 GPL o MPL, o > percentil 99), en dos o más ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas, determinados por una prueba de ELISA estandarizada

Anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI IgG y/o IgM en suero o plasma con un título > percentil 99, en dos o más ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas, determinados por una prueba de ELISA estandarizada

Convenciones: GPL: unidades de IgG; MPL: unidades de IgM;  $\beta_2$ GPI:  $\beta_2$  glicoproteína I

**Tabla 2.** Manifestaciones clínicas asociadas al síndrome antifosfolípido

Manifestación	%
Trombosis de venas profundas	31,7
Trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ $\mu$ L)	21,9
<i>Livedo reticularis</i>	20,4
Accidente cerebrovascular	13,1
Tromboflebitis superficial	9,1
Embolismo pulmonar	9,0
Pérdida fetal	8,3
Isquemia transitoria	7,0
Anemia hemolítica	6,6
Úlceras en piel	3,9
Epilepsia	3,4
Lesiones seudovasculares en piel	2,6
Infarto de miocardio	2,8
Amaurosis fugaz	2,8
Gangrena digital	1,9

efectos estimulantes sobre la función plaquetaria [15]. Recientemente se ha demostrado que la activación del complemento está directamente involucrada en la pérdida fetal, la trombosis, y la activación de la célula endotelial, provocada por anticuerpos antifosfolípidos [16-19].

## Hallazgos clínicos y de laboratorio

Para establecer el diagnóstico de síndrome antifosfolípido se utilizan los criterios de Sapporo, recientemente revisados, criterios que se incluyen en la **tabla 1** [20].

Además de los eventos trombóticos arteriales y venosos incluyendo el infarto cerebral, el accidente cerebrovascular y la trombosis venosa profunda, por lo que este síndrome es bien reconocido, el síndrome antifosfolípido se puede presentar clínicamente con un número importante de eventos no necesariamente relacionados con eventos trombóticos [5, 21, 22]. Éstos incluyen lesiones en una válvula cardíaca, *livedo reticularis* (una condición vascular que se caracteriza por una coloración púrpura de la piel, usualmente en los miembros inferiores), trombocitopenia idiopática y manifestaciones neurológicas como la corea, la epilepsia y la mielopatía transversa [20, 23-31]. En la **tabla 2** se enumeran otras características clínicas asociadas al síndrome antifosfolípido [32] y en la **tabla 3** otras pruebas de laboratorio que no están incluidas en los criterios de diagnóstico vigentes por su baja especificidad o su falta de estandarización [20].

Algunas complicaciones raras o poco frecuentes del síndrome antifosfolípido incluyen el denominado síndrome antifosfolípido catastrófico, que se presenta en menos del 1% de los casos, caracterizado por la presencia de una microangiopatía trombótica diseminada, entidad que dificulta su diagnóstico diferencial de una púrpura trombótica trombocitopénica, de una coagulación intravascular diseminada, de una hemorragia alvéolo-pulmonar, de un síndrome de enfermedad respiratoria aguda [33, 34] o de una oclusión venosa en órganos como las glándulas adrenales con insuficiencia adrenal [35], de riñones [36], o del hígado (síndrome Budd-Chiari) [35]. Se ha reportado también la relación del síndrome antifosfolípido con la presencia de osteonecrosis, pero todavía es un tema no resuelto y controvertido [37].

## Diagnóstico

El síndrome antifosfolípido es una enfermedad caracterizada por presentar trombosis vascular, pérdidas recurrentes de embarazo y trombocitopenia, asociada con pruebas positivas para

**Tabla 3.** Otras pruebas de laboratorio para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido

Anticuerpos anticardiolipina IgA

Anticuerpos antifosfatidilserina

Anticuerpos antifosfatidil-etanolamina

Anticuerpos antiprotrombina

Anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina-protrombina

anticuerpos anticardiolipina y/o anticoagulante lúpico. Los anticuerpos antifosfolípidos son autoanticuerpos dirigidos contra fosfolípidos aniónicos (cargados negativamente) o contra complejos de proteínas y fosfolípidos [38]. Los anticuerpos antifosfolípidos pueden ser medidos por inmunoensayos en fase sólida (las anticardiolipinas) o como la actividad de prolongar las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos (anticoagulante lúpico) [39].

## Anticoagulante lúpico

La prueba de anticoagulante lúpico mide la habilidad de los anticuerpos antifosfolípidos para prolongar las reacciones de la coagulación dependientes de fosfolípidos. La positividad del anticoagulante lúpico se atribuye a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos *in vitro*. No obstante, debe tenerse presente que el déficit de factores de coagulación o la presencia de otros inhibidores de los factores de coagulación (por ejemplo el anti-Factor VIII) puede también prolongar los tiempos de coagulación.

La identificación del anticoagulante lúpico se debe realizar siguiendo estos pasos [39]:

1. Demostración de un resultado anormal de alguna de las pruebas de tamización dependientes de fosfolípidos (como son el tiempo parcial de tromboplastina, el tiempo de veneno de víbora de Russell, el tiempo de coagulación con kaolín o el tiempo de protrombina con diluciones),
2. Falta de corrección de la prolongación de los tiempos de coagulación en las pruebas de mezclas con plasma normal (pobre en plaquetas),
3. Disminución o corrección del tiempo de coagulación, en una prueba de tamización, al agregar un exceso de fosfolípidos o por la utilización de fosfolípidos en fase hexagonal (un fenómeno que sólo se observa en presencia de anticoagulante lúpico); y,
4. La exclusión de otras coagulopatías (por ejemplo, inhibidores de Factor VII o la presencia de heparina o anticoagulantes orales). La determinación de anticoagulante lúpico se ve afectada en pacientes que reciben tratamiento con anticoagulantes orales o con heparina.

## Anticuerpos anticardiolipina

La prueba de anticuerpos anticardiolipina [40] se ideó para el diagnóstico de pacientes con síndrome antifosfolípido. La primera prueba se desarrolló en 1983 y posteriormente fue estandarizada por varios grupos [41-44]. La prueba para detectar anticuerpos anticardiolipina descrita en 1983, se realizaba mediante una técnica de radioinmunoensayo que utilizaba cardiolipina como antígeno, junto con una mezcla de buffer de fosfato (PBS) con gelatina empleada como diluyente de muestras y del conjugado, y anticuerpos anti IgG o IgM humana marcados con yodo radiactivo [40]. Posteriormente se modificó el método empleando suero de bovino fetal o suero de bovino adulto que reemplazaron a la gelatina en la preparación del diluyente de las muestras y de la solución del conjugado, y los anticuerpos anti IgG o IgM humana fueron marcados con una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa), para reemplazar a los antisueros marcados con material radiactivo.

En 1990 tres grupos de investigadores independientemente encontraron que el incremento observado en el valor de las lecturas que se observa cuando se usa suero de bovino en el diluyente de las muestras, se debía a la presencia de anticuerpos específicos contra la  $\beta_2$  glicoproteína I [6, 45,

46]. La  $\beta_2$  glicoproteína I es una proteína de 50 kDa presente en el suero fetal o adulto bovino, que se une a los fosfolípidos cargados negativamente. Ahora se sabe y se acepta que los sueros de los pacientes con síndrome antifosfolípido contienen una mezcla de anticuerpos específicos contra la  $\beta_2$  glicoproteína I [47], contra fosfolípidos de carga negativa [48], y otros dirigidos contra proteínas como la protrombina [49].

Desde que se reconoció la asociación clínica entre los anticuerpos anticardiolipina con trombosis arterial y venosa, y pérdidas fetales recurrentes, se han incrementado enormemente las demandas de pruebas de tamización, así como de pruebas confirmatorias. Las manifestaciones clínicas de síndrome antifosfolípido se asocian con valores positivos persistentes, que oscilan entre títulos medios y altos, de una prueba de anticuerpos anticardiolipina positiva (o antifosfolípidos) usualmente del isotipo IgG [50]. No obstante, se ha informado que los anticuerpos anticardiolipina IgM y ocasionalmente los de isotipo IgA, también están asociados con manifestaciones clínicas de síndrome antifosfolípido [51].

Desde que la prueba de anticardiolipina se describió por primera vez, se cuestionó la validez de sus resultados. La prueba además de ser positiva en pacientes con síndrome antifosfolípido, se encuentra elevada en un alto porcentaje de pacientes que padecen otras enfermedades autoinmunes y particularmente en el suero de individuos con enfermedades infecciosas como sífilis, SIDA, fiebre Q, enfermedad de Lyme, hepatitis C, tuberculosis, etc. [52]. Sin embargo, algunos de esos resultados “falsos positivos” muestran títulos bajos de anticardiolipina, mientras que los pacientes con síndrome antifosfolípido tienden a mostrar niveles altos.

Se han llevado a cabo varios intentos para estandarizar la prueba de anticardiolipina. En el Primer Taller para la Estandarización de las Pruebas para Anticuerpos Anticardiolipina, se determinaron los métodos más adecuados para validar los niveles de anticuerpos anticardiolipina [41]. Además, se establecieron las unidades de medidas y se introdujo el uso de seis calibradores para ayudar a los laboratorios de todo el mundo a realizar la prueba de anticardiolipina. En el Segundo Taller se aceptó que cuando se miden los anticuerpos anticardiolipina, lo más adecuado es expresar los resultados en forma semicuantitativa, y de esa manera se mejora la correlación de los resultados entre los diferentes laboratorios [42]. En el Tercer y Cuarto Talleres se procuraron resolver problemas que estaban relacionados con la especificidad de los anticuerpos anticardiolipina y se examinaron algunos *kits* comerciales para la detección de anticardiolipina y de anti- $\beta_2$  glicoproteína I [43, 44].

Otro de los problemas que se han descrito con la detección de anticuerpos anticardiolipina, a pesar de resultar muy efectiva para el tratamiento adecuado de pacientes con trombosis o pérdidas recurrentes de embarazo, es la falla en la concordancia de los resultados entre los diferentes *kits* y entre los diferentes laboratorios [53]. Diversas organizaciones nacionales e internacionales han contribuido con la estandarización de la prueba que detecta anticuerpos anticardiolipina. Por ejemplo, el Colegio Americano de Patólogos acredita a los laboratorios que participan en un programa *ad hoc* para el control de calidad en los exámenes de anticardiolipina. El Foro Europeo de Antifosfolípidos (*European Antiphospholipid Forum*) en un importante estudio cooperativo, que incluyó 30 centros de referencia de toda Europa, demostró que en la mayoría de los casos, las discrepancias observadas entre los laboratorios se deben principalmente a las técnicas con las que se han realizado las pruebas, la manera en que han sido calibradas y los puntos de corte con que se calculan los resultados [54]. El estudio también mostró que cuando los laboratorios utilizaban técnicas de ELISA estandarizadas (lo que algunos autores llaman *kits* “consensus”), como se había descrito anteriormente [38], y se calculan los resultados en una manera uniforme, la correlación entre los resultados de los diferentes laboratorios mejora notablemente [54]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos problemas son comunes en el desarrollo de cualquier técnica de ELISA y no son propios de la prueba de anticardiolipina.

Además se aconseja para asegurarse de resultados más exactos, utilizar un control positivo que tenga valores definidos en un rango previamente determinado y usar calibradores o estándares para realizar la curva de calibración. Si el valor del control se encuentra fuera de los límites definidos, la prueba debe repetirse.

Para los laboratorios que utilizan rutinariamente la prueba de anticardiolipina, se recomienda el uso de un *kit* que sea de marca reconocida, que esté validado para la determinación de anticardiolipina por ELISA y que emplee una curva de calibración en unidades GPL, MPL o APL (1 unidad GPL o MPL o APL = 1  $\mu\text{g}$  de anticuerpo antifosfolípido IgG, IgM o IgA purificado por afinidad/mL, respectivamente). Es recomendable también el uso de controles positivos y negativos por separado, y que el control positivo tenga un valor definido y un rango establecido. El uso de un control positivo adicional permite al operador decidir si la corrida de las muestras es aceptable o no. Si el valor positivo cae por debajo o por encima del rango predefinido, las muestras deben ser repetidas por completo. No se debe hacer la prueba sin una curva de calibración.

Como ya se mencionó, las pruebas que detectan anticuerpos anticardiolipina que se usan actualmente utilizan la técnica de ELISA estándar. Se recomienda dar los resultados por isotipo (por ejemplo: IgG, IgM o IgA) y además reportar los resultados en niveles de positividad. Debido a las posibles variaciones entre los laboratorios, los niveles de anticardiolipina deben ser también informados en forma semicuantitativa como “alto” (> de 80 unidades GPL, MPL o APL), “medio” ( $\geq 20$  a 80 unidades) o “bajo” ( $\geq 10$  a < 20 unidades). Un valor positivo, entre medio y alto para IgG e IgM, o raramente para IgA, se considera más específico para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido, aunque se han observado manifestaciones clínicas de síndrome antifosfolípido en pacientes con títulos bajos de anticardiolipina para los isotipos IgG e IgM, particularmente con un anticoagulante lúpico positivo. Con frecuencia los resultados de la prueba se informan también en unidades GPL, MPL y APL. Sin embargo, se ha observado una mayor concordancia en los resultados interlaboratorios, cuando las pruebas se informan en forma semicuantitativa; por ejemplo: “positivo bajo”, “positivo medio” o “positivo alto” [42].

Para los laboratorios que preparan su propio *kit* para anticuerpos anticardiolipina, se han publicado detalles descriptivos de la técnica [38]. No obstante, para realizar las pruebas adecuadamente, las personas encargadas deben adquirir experiencia en corregir los problemas e inconvenientes que se presentan frecuentemente.

Inicialmente, los estudios que correlacionaron la positividad de los anticuerpos anticardiolipina con la presencia de manifestaciones clínicas de síndrome antifosfolípido mostraron que los pacientes con niveles altos eran más propensos a tener trombosis o complicaciones en el embarazo y en otras enfermedades, que aquellos con niveles bajos de anticuerpos [55-57].

## Pruebas de laboratorio confirmatorias para el síndrome antifosfolípido

Recientemente se han desarrollado otras pruebas que son adecuadas para confirmar el diagnóstico de síndrome antifosfolípido. La primera y más intensamente estudiada es la prueba que detecta anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I. Esta prueba es un ELISA indirecto que utiliza como antígeno la  $\beta_2$  glicoproteína I pegado al plato de microtitulación. Los estudios publicados muestran que la  $\beta_2$  glicoproteína I, particularmente cuando se pega a placas oxidadas o a placas de poliestireno de alta afinidad para ELISA, es un antígeno relativamente más específico para los anticuerpos presentes en los pacientes con síndrome antifosfolípido comparado con la cardiolipina [47]. Estudios llevados a cabo por diversos laboratorios muestran que la sensibilidad de la prueba de anti- $\beta_2$  glicoproteína I para síndrome antifosfolípido, varía entre 40% y 90% [47]. En nuestra experiencia y luego de analizar 54 muestras para síndrome antifosfolípido, la sensibilidad de la prueba anti- $\beta_2$  glicoproteína I es de aproximadamente 74% [58].

En cuanto a la especificidad clínica de los anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I obtenida por distintos grupos de investigadores y dependiendo de los sueros de pacientes seleccionados y de la técnica utilizada, varía entre 30% y 82% [59, 60]. En una serie de experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, 18 de las 184 muestras evaluadas de pacientes sin síndrome antifosfolípido (que tenían sífilis u otras enfermedades infecciosas o autoinmunes con resultados de anticuerpos anticardiolipina positivos) mostraron una especificidad del 82% [58]. En general la mayoría de los investigadores han demostrado que para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido, la prueba de los anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I es más específica que los anticuerpos anticardiolipina determinados por ELISA [61].

Una segunda prueba desarrollada para confirmar el diagnóstico de síndrome antifosfolípido es la que busca anticuerpos antifosfolípidos, por ELISA, pero que utiliza como antígeno una mezcla de fosfolípidos de carga negativa en vez de cardiolipina. Esta prueba, conocida con el nombre de "APhL ELISA Kit" (Louisville APL Diagnostics, Seabrook, Texas, Estados Unidos), fue desarrollada por uno de los autores de este artículo (Pierangeli, S) y por el Dr. E. Nigel Harris [59]. Durante el desarrollo de esta prueba, los fosfolípidos de carga negativa a ser utilizados como antígeno, fueron analizados en forma individual y en diferentes combinaciones cuali y cuantitativas, para determinar la mejor composición antigénica que permitiría diferenciar los sueros de pacientes con síndrome antifosfolípido de las muestras de pacientes con anticardiolipina positiva pero sin síndrome antifosfolípido. Se logró una mezcla de fosfolípidos que mostró ser la de mayor sensibilidad y especificidad para la detección de síndrome antifosfolípido. Varios trabajos de diferentes grupos de investigadores se publicaron con resultados de los análisis de este nuevo antígeno [38]. El estudio más grande realizado, incluyó 438 sueros de pacientes con distintas enfermedades del tejido conectivo, 33 pacientes con síndrome antifosfolípido y 200 de controles sanos. Todos los sueros se evaluaron mediante la prueba de anticuerpos anticardiolipina y la APhL ELISA [38]. En este estudio todos los pacientes con síndrome antifosfolípido mostraron ser positivos para anticardiolipina y 30 de 33 fueron positivos cuando se utilizó APhL ELISA (90,9% de sensibilidad). En pacientes sin síndrome antifosfolípido, 45 de 438 mostraron ser anticardiolipina positivos, pero sólo 9 de 438 sueros mostraron ser positivos con el APhL ELISA (99,5% de especificidad) [60].

En los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, la prueba APhL ELISA mostró tener una sensibilidad del 98% y una especificidad del 99% [38]. Estos datos indican claramente que el *kit* de APhL ELISA es altamente específico y sensible para identificar pacientes con síndrome antifosfolípido.

En otro estudio realizado por el Dr. Santiago y colaboradores en Brasil [61], se analizaron muestras de pacientes con sífilis, leptospirosis y leishmaniasis (kala-azar) con la prueba estándar de anticardiolipina por ELISA, con el *kit* APhL ELISA y con la prueba anti- $\beta_2$  glicoproteína I por ELISA. Los datos demostraron que el *kit* de APhL ELISA y el ELISA para anti- $\beta_2$  glicoproteína I son más específicos (96,3% y 76,0%, respectivamente) que la prueba de anticardiolipina por ELISA, que sólo mostró una especificidad de 63%.

## Pautas para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido

Es imperativo destacar la importancia de la correcta identificación de los pacientes con síndrome antifosfolípido, debido a que la terapia profiláctica anticoagulante puede reducir los riesgos de recurrencias de trombosis, y el tratamiento en las mujeres afectadas durante el embarazo puede disminuir la incidencia de las pérdidas fetales. Además, como existen diversos tipos de trombosis y pérdidas de embarazo no atribuidas al síndrome antifosfolípido, la confirmación del diagnóstico de síndrome antifosfolípido es de vital importancia y depende asimismo del hallazgo de una prueba positiva para anticuerpos antifosfolípidos o de anticoagulante lúpico positivo en el paciente. Durante el Octavo Simposio Internacional sobre Anticuerpos Antifosfolípidos, un foro

de expertos, en una sesión especial, concluyó que estas dos pruebas debían ser usadas como pruebas fundamentales en el diagnóstico de síndrome antifosfolípido [62]. Posteriormente, en una reunión internacional de expertos, en el año 2004, en Sydney Australia, se decidió incluir la prueba de anti- $\beta_2$  glicoproteína I como parte del criterio de diagnóstico del síndrome antifosfolípido [20, 63, 64].

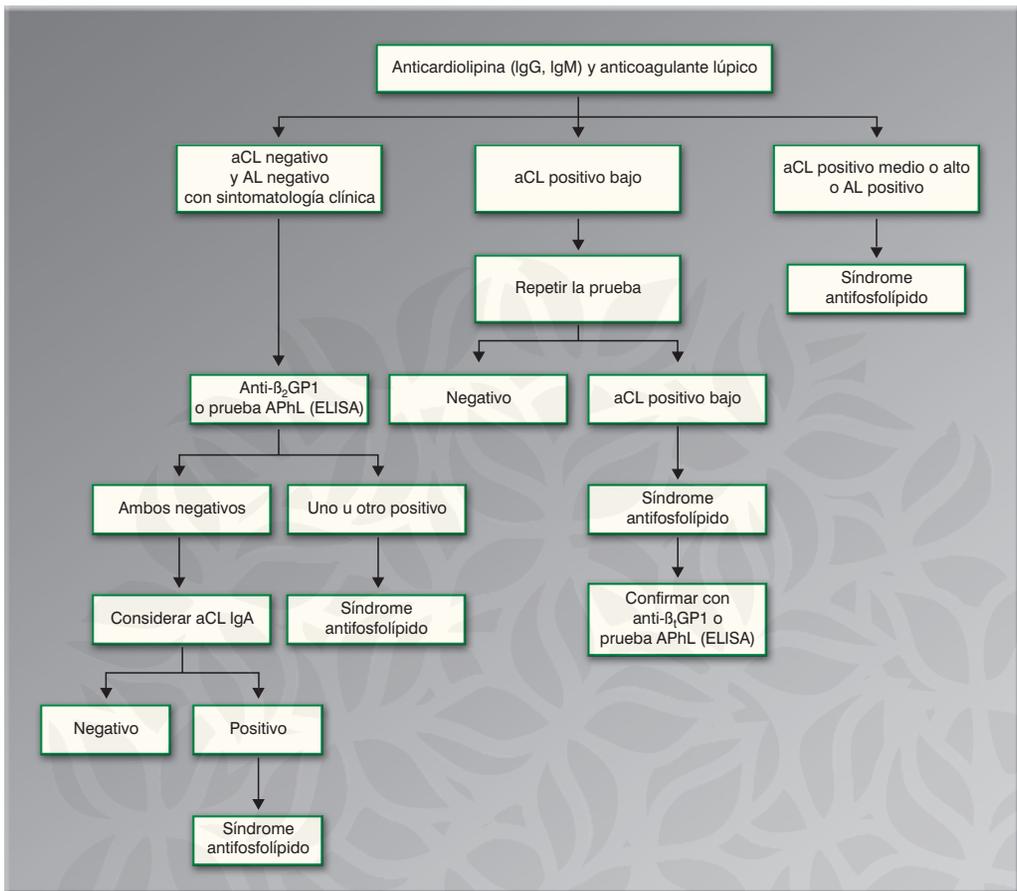
Como se presentó en la **tabla 1**, el diagnóstico de síndrome antifosfolípido se debe hacer en pacientes con evidencia de manifestaciones clínicas bien documentadas (por ejemplo trombosis arterial o venosa, o pérdidas de embarazo) características de síndrome antifosfolípido y un resultado con niveles de moderados a altos de anticardiolipina IgG (> 40 unidades) o anticoagulante lúpico positivo [65].

Como muestra el algoritmo en la **figura 1**, a los pacientes en los que se sospecha tener síndrome antifosfolípido se les debe solicitar la realización simultánea de anticardiolipina para los isotipos IgG e IgM y la prueba de anticoagulante lúpico, ya que una de las pruebas puede ser positiva y la otra no. De acuerdo con los resultados, las conductas a seguir serían las siguientes:

1. Si el resultado de la prueba de anticuerpos anticardiolipina es positivo alto o medio o el anticoagulante lúpico es positivo, el diagnóstico de síndrome antifosfolípido es positivo.
2. Si la prueba de anticardiolipina da resultado positivo bajo, hay que repetir la prueba. Si la prueba da nuevamente positivo bajo, el diagnóstico de síndrome antifosfolípido es positivo, pero se debe confirmar el diagnóstico mediante una prueba de anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I o con APhL ELISA. Si el resultado es negativo, se deben seguir los pasos del Punto 1.
3. Si las pruebas de anticardiolipina y anticoagulante lúpico son negativas, en pacientes con sintomatología clínica, se debe realizar la prueba de anti- $\beta_2$  glicoproteína I o el APhL ELISA. Si estas dos pruebas dan resultados negativos, habría que considerar realizar la prueba de anticardiolipina IgA. Si esta prueba da también un resultado negativo, el diagnóstico de síndrome antifosfolípido es negativo. Si la prueba de IgA da positiva, el diagnóstico de síndrome antifosfolípido es positivo.
4. Si alguna de las pruebas anti- $\beta_2$  glicoproteína I o APhL ELISA da positiva, el diagnóstico de síndrome antifosfolípido es positivo.

Además de las situaciones enunciadas en el algoritmo, hay otras circunstancias en las cuales las pruebas anti- $\beta_2$  glicoproteína I y APhL ELISA también pueden ser utilizadas para confirmar el diagnóstico de síndrome antifosfolípido. Estas situaciones incluyen:

- Pacientes con trombosis arterial o venosa o pérdida de embarazos con valores positivos bajos de anticardiolipina IgG o que tienen solamente anticuerpos anticardiolipina IgM o IgA positivos.
- Pacientes con historia dudosa de síndrome antifosfolípido que incluya por ejemplo trombocitopenia idiopática, tromboflebitis, aterosclerosis, pérdida de embarazo en el primer trimestre o situaciones en las que la trombosis venosa o arterial o la pérdida recurrente de embarazo, puedan ser atribuibles a otros factores no relacionados a un síndrome antifosfolípido.
- Presentación inusual de síndrome antifosfolípido. Por ejemplo se incluye: corea, mielopatía transversa, *livedo reticularis*, úlceras en los miembros inferiores, lesiones valvulares del corazón ocurridas en ausencia de embarazo o de trombosis.
- Pacientes con manifestaciones clínicas que sugieren síndrome antifosfolípido pero con pruebas de anticardiolipina y anticoagulante lúpico negativas.



**Figura 1.** Algoritmo para el diagnóstico por el laboratorio de síndrome antifosfolípido.

Convenciones: aCL: anticuerpos anticardiolipina; AL: anticoagulante lúpico; anti-β<sub>2</sub>GP1: anticuerpos anti-β<sub>2</sub> glicoproteína 1.

Como consecuencia de los estudios realizados con las pruebas de anticuerpos anti-β<sub>2</sub> glicoproteína I y APhL ELISA, que demostraron excelente sensibilidad y especificidad, es posible recomendar que estas pruebas puedan ser usadas en la tamización inicial para síndrome antifosfolípido en lugar de los anticuerpos anticardiolipina por ELISA.

En estudios recientes se ha reportado también que los pacientes con síndrome antifosfolípido tienen anticuerpos que se unen a otras proteínas que incluyen, por ejemplo, la protrombina, la proteína C, la proteína S y las anexinas (anexina A2 y anexina A5). El valor diagnóstico de estas pruebas es sin embargo, todavía cuestionable. Estas pruebas necesitan ser validadas y estandarizadas antes que se puedan utilizar en el diagnóstico o confirmación de síndrome antifosfolípido.

## Tratamiento

El tratamiento de la trombosis en el síndrome antifosfolípido incluye anticoagulación, inicialmente puede ser con heparina endovenosa o con heparina de bajo peso molecular por ejemplo enoxaparina subcutánea, seguida de tratamiento con anticoagulantes orales con warfarina (coumadin) básicamente de por vida [66-69].

La hidrocloroquina se incluye frecuentemente como un tratamiento integral en el síndrome antifosfolípido, particularmente si el paciente además padece concomitantemente de lupus eritematoso sistémico [70].

En pacientes con eventos tromboticos recurrentes, además del mencionado tratamiento anticoagulante, se recomienda frecuentemente adicionar aspirina en bajas dosis (81 mg, diariamente).

Cuando se utiliza anticoagulante oral con warfarina, el INR (que es la Relación Normalizada Internacional) debe mantenerse entre 2,0 y 3,0 [66-69]. Los valores más altos de INR, recomendados por algunos autores para prevenir la trombosis arterial, tienden a producir hemorragias [66-69, 71] y la mayoría de los clínicos están en favor de utilizar un INR entre 2,0 y 3,0. Asimismo se recomienda investigar la presencia de alguna otra causa posible de trombofilia, por ejemplo Factor V Leiden o mutaciones del gen de la protrombina, etc.

Es necesario enfatizar en los pacientes con síndrome antifosfolípido, la búsqueda de otros factores protromboticos que deben ser eliminados; esto incluye el fumar, la terapia de reemplazo hormonal conteniendo estrógenos y el uso de drogas ilícitas como la cocaína sola o combinada con otras drogas. En la evaluación clínica de los pacientes con lupus eritematoso sistémico por ejemplo, y antes de la prescripción de anticoagulantes orales conteniendo estrógenos, debe evaluarse cuidadosamente en las mujeres, si son positivas para anticuerpos antifosfolípidos. Si es así, deben ser evitadas las píldoras anticonceptivas que contienen estrógenos.

Existen también personas que pueden tener síndrome antifosfolípido subclínico o asintomático, con anticuerpos anticardiolipina positivos, pero sin evidencias clínicas de trombosis o pérdidas fetales. Si los factores de riesgo adicionales están presentes, la posibilidad de trombosis es mucho mayor. Es aún discutido el enfoque que se debe dar en los pacientes con anticuerpos antifosfolípidos que no han experimentado eventos tromboticos previos. Las opiniones de los clínicos están divididas. Algunos recomiendan profilaxis con aspirina en bajas dosis, otros son partidarios de un tratamiento más agresivo, mientras otros recomiendan no hacer ningún tratamiento. En un estudio reciente se demostró que la eficacia de la profilaxis con bajas dosis de aspirina no muestra ser efectiva en prevenir eventos tromboticos [72].

Para el síndrome antifosfolípido catastrófico se utiliza frecuentemente la plasmaféresis. Sin embargo no hemos sabido de estudios que validen este enfoque terapéutico [33]. Además, otros investigadores utilizan inmunoglobulina endovenosa y/ o agentes inmunosupresores. Recientemente se reportó la utilización de rituximab, que es un anticuerpo monoclonal que selectivamente reduce los linfocitos B (CD20-positivos), en el síndrome antifosfolípido catastrófico. Este tratamiento resultó exitoso en un grupo pequeño de pacientes que no respondían a tratamientos tradicionales [73].

La trombosis *per se* es una consecuencia grave en pacientes con síndrome antifosfolípido primario y síndrome antifosfolípido secundario y puede afectar cualquier órgano. La recurrencia de trombosis con anticuerpos antifosfolípidos es alta. El síndrome antifosfolípido ocurre predominantemente en mujeres jóvenes y la variedad de los síntomas, combinada con la alta morbilidad, exige un tratamiento adecuado. Además, esta enfermedad está asociada con un impacto socioeconómico importante, ya que lleva frecuentemente a la incapacidad física por largo tiempo e incluye tratamientos costosos.

Como se indicó, en casos de manifestaciones tromboticas, los tratamientos se enfocan en prevenir eventos tromboembólicos utilizando medicamentos antitromboticos o modulando la respuesta inmune. Se han reportado recurrencias producidas a pesar del tratamiento, aun con el uso de anticoagulantes orales en valores relativamente altos de INR. Este tipo de tratamiento, que incluye un periodo largo de tiempo, está asociado con alto riesgo de hemorragias, con monitoreos frecuentes y el cumplimiento de una dieta y estilo de vida por parte del paciente, para que

la terapia sea efectiva. Es evidente entonces, que existe la necesidad de establecer nuevas y más eficientes modalidades para el tratamiento de la trombosis en el síndrome antifosfolípido.

## Conclusiones

El síndrome antifosfolípido está caracterizado por la presencia de trombosis recurrentes arteriales y venosas, así como de pérdidas del embarazo, asociadas con la presencia de anticuerpos anticardiolipina y/o de anticoagulante lúpico. La primera prueba para los anticuerpos anticardiolipina se desarrolló en 1983 y posteriormente fue estandarizada. La prueba de anticardiolipina por ELISA es sensible, pero no es muy específica para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido. Existen actualmente pruebas más específicas. No obstante, los ensayos de anticardiolipina por ELISA y anticoagulante lúpico son las primeras determinaciones que deben ser usadas para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido. Las nuevas pruebas como la determinación de los anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I por ELISA y el APhL por ELISA utilizan diferentes antígenos y han demostrado ser más específicas y sensibles para una confirmación más adecuada del síndrome antifosfolípido. Estas pruebas de laboratorio mantienen también una muy buena alta sensibilidad y especificidad diagnóstica. Otras pruebas como las de ELISA para anticuerpos anti-protrombina y anticuerpos anti-anexina A5, necesitan ser estandarizadas y evaluadas antes de ser adoptadas como determinaciones de rutina en el diagnóstico de síndrome antifosfolípido.

**Summary:** Antiphospholipid antibodies are associated with thrombosis and pregnancy losses in patients with the antiphospholipid syndrome. Several pathogenic mechanisms have been described to explain clinical manifestations produced by antiphospholipid antibodies. This review addresses current modalities of treatment as well as an update on tests used for the confirmation of the diagnosis of antiphospholipid syndrome. The anticardiolipin test has been widely utilized by physicians since the mid-1980's for diagnosing patients with antiphospholipid syndrome. Establishment of this diagnosis has enabled effective management of patients with recurrent thrombosis and recurrent pregnancy losses. The test was first established in 1983 as a radioimmunoassay and soon thereafter converted into an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The other test commonly used in the diagnosis of antiphospholipid syndrome is the lupus anticoagulant test. The anticardiolipin test by ELISA is sensitive for the diagnosis of antiphospholipid syndrome but lacks specificity. On the other hand, the lupus anticoagulant assay, although more specific is not as sensitive as the anticardiolipin ELISA assay. More specific tests are now available such as the anti- $\beta_2$  glycoprotein I (anti- $\beta_2$ GPI), the anti-prothrombin (anti-PT) assay and the APhL ELISA test that utilizes negatively charged phospholipids instead of cardiolipin to coat the plates. This article discusses in detail the clinical value of the above-mentioned tests, technical problems associated with them, the current laboratory classification criteria for diagnosis of antiphospholipid syndrome and possible new and better assays that will be available in the near future for diagnosis of antiphospholipid syndrome.

**Keywords:** Anticardiolipin antibodies, antiphospholipid antibodies, lupus anticoagulant, anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies.

**Pierangeli SS, Pierangeli HR.** Antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms, diagnosis and treatment. *Medicina & Laboratorio* 2008; 14: 111-124.

Module 1 (Clinic and laboratory), number 67. Editora Médica Colombiana S.A., 2008®.

Received on February 10, 2008; accepted on March 25, 2008.

## Bibliografía

- Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol* 1987; 26: 324-326.
- Harris EN. Antiphospholipid syndrome. *In* Rheumatology, Kippel JH, Dieppe PA. Mosby-Year Book; London. 1994. Section 6:32.1-32.6.
- Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, Elkon KB, Loizou S, Hughes GR. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983; 287: 1021-1023.
- Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, et al. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 997-1002.
- McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Rubertone MV, et al. The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1226-1232.
- McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krillis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 4120-4124.
- Atsumi T, Koike T. Clinical relevance of antiprothrombin antibodies. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 49-53.
- Lin WS, Chen PC, Yang CD, Cho E, Hahn BH, Grossman J, et al. Some antiphospholipid antibodies recognize conformational epitopes shared by beta2-glycoprotein I and the homologous catalytic domains of several serine proteases. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1638-1647.
- Chen XX, Gu YY, Li SJ, Qian J, Hwang KK, Chen PP, et al. Some plasmin-induced antibodies bind to cardiolipin, display lupus anticoagulant activity and induce fetal loss in mice. *J Immunol* 2007; 178: 5351-5356.
- Cesarman-Maus G, Rios-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, Cravioto Mdel C, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood* 2006; 107: 4375-4382.
- Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, Creighton KA, Abbott TM, Hammond EH, et al. Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 210-216.
- Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction of anti-phospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3069-3073.
- Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 1999; 99: 1997-2002.
- Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermylen J, Hoylaerts MF, et al. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood* 2003; 101: 157-162.
- Roubey RA. Mechanisms of autoantibody-mediated thrombosis. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S114-119.
- Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002; 195: 211-220.
- Salmon JE, Girardi G, Holers VM. Complement activation as a mediator of antiphospholipid antibody induced pregnancy loss and thrombosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61 Suppl 2: ii46-50.
- Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2120-2124.
- Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* 2005; 106: 2340-2346.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
- Moroni G, Ventura D, Riva P, Panzeri P, Quaglini S, Banfi G, et al. Antiphospholipid antibodies are associated with an increased risk for chronic renal insufficiency in patients with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 28-36.
- Moroni G, Tantardini F, Gallelli B, Quaglini S, Banfi G, Poli F, et al. The long-term prognosis of renal transplantation in patients with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 903-911.
- Gleason CB, Stoddard MF, Wagner SG, Longaker RA, Pierangeli S, Harris EN. A comparison of cardiac valvular involvement in the primary antiphospholipid syndrome versus anticardiolipin-negative systemic lupus erythematosus. *Am Heart J* 1993; 125: 1123-1129.
- Toubi E, Krause I, Fraser A, Lev S, Stojanovich L, Rovensky J, et al. Livedo reticularis is a marker for predicting multi-system thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23: 499-504.
- Atsumi T, Furukawa S, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* 2005; 14: 499-504.
- Brey RL, Levine SR. Treatment of neurologic complications of antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus* 1996; 5: 473-476.
- Sherer Y, Hassin S, Shoenfeld Y, Levy Y, Livneh A, Ohry A, et al. Transverse myelitis in patients with antiphospholipid antibodies—the importance of early diagnosis and treatment. *Clin Rheumatol* 2002; 21: 207-210.
- Al-Matar M, Jaimes J, Malleon P. Chorea as the presenting clinical feature of primary antiphospholipid syndrome in childhood. *Neuropediatrics* 2000; 31: 107-108.
- Hughes GR. Migraine, memory loss, and "multiple sclerosis". Neurological features of the antiphospholipid (Hughes') syndrome. *Postgrad Med J* 2003; 79: 81-83.

30. Mesa HA, Lang B, Schumacher M, Vaith P, Peter HH. Sneddon's syndrome and phospholipid antibodies. *Clin Rheumatol* 1993; 12: 253-256.
31. Shoenfeld Y, Lev S, Blatt I, Blank M, Font J, von Landenberg P, et al. Features associated with epilepsy in the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 2004; 31: 1344-1348.
32. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1019-1027.
33. Asherson RA. Multiorgan failure and antiphospholipid antibodies: the catastrophic antiphospholipid (Asherson's) syndrome. *Immunobiology* 2005; 210: 727-733.
34. Wiedermann FJ. Alveolar and serum antiphospholipid antibodies in acute respiratory distress syndrome associated with catastrophic antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 413.
35. Asherson RA, Cervera R. Unusual manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003; 25: 61-78.
36. Nzerue CM, Hewan-Lowe K, Pierangeli S, Harris EN. "Black swan in the kidney": renal involvement in the antiphospholipid antibody syndrome. *Kidney Int* 2002; 62: 733-744.
37. Tektonidou MG, Malagari K, Vlachoyiannopoulos PG, Kelekis DA, Moutsopoulos HM. Asymptomatic avascular necrosis in patients with primary antiphospholipid syndrome in the absence of corticosteroid use: a prospective study by magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 732-736.
38. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44: 48-57; quiz 58-49.
39. Triplett DA, Brandt JT. Lupus anticoagulants: misnomer, paradox, riddle, epiphenomenon. *Hematol Pathol* 1988; 2: 121-143.
40. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-1214.
41. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 215-222.
42. Harris EN. Special report. The Second International Anticardiolipin Standardization Workshop/the Kingston Antiphospholipid Antibody Study (KAPS) group. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 476-484.
43. Harris EN, Pierangeli S, Birch D. Anticardiolipin wet workshop report. Fifth International Symposium on antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 616-624.
44. Pierangeli SS, Stewart M, Silva LK, Harris EN. An antiphospholipid wet workshop: 7th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol* 1998; 25: 156-160.
45. Tsutsumi A, Koike T. Measurement of anti-Beta2 glycoprotein I. *In* Hughes syndrome: Antiphospholipid syndrome, Khamashta MA. Springer; London, England. 2000;238-244.
46. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-1547.
47. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336: 177-178.
48. Pierangeli SS, Harris EN, Davis SA, DeLorenzo G. Beta 2-glycoprotein 1 (beta 2GPI) enhances cardiolipin binding activity but is not the antigen for antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1992; 82: 565-570.
49. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-632.
50. Loizou S, Byron MA, Englert HJ, David J, Hughes GR, Walport MJ. Association of quantitative anticardiolipin antibody levels with fetal loss and time of loss in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1988; 68: 525-531.
51. Wilson WA, Faghiri Z, Taheri F, Gharavi AE. Significance of IgA antiphospholipid antibodies. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S110-113.
52. Gharavi AE, Pierangeli SS. Infection and antiphospholipid antibodies. *In* Hughes syndrome, Khamashta MA. Springer; London, England. 2000; 135-143.
53. Peaceman AM, Silver RK, MacGregor SN, Socol ML. Interlaboratory variation in antiphospholipid antibody testing. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1780-1784; discussion 1784-1787.
54. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations--a cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost* 2001; 86: 575-583.
55. Levine SR, Salowich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, et al. IgC anticardiolipin antibody titer > 40 GPL and the risk of subsequent thrombo-occlusive events and death. A prospective cohort study. *Stroke* 1997; 28: 1660-1665.
56. Harris EN, Chan JK, Asherson RA, Aber VR, Gharavi AE, Hughes GR. Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med* 1986; 146: 2153-2156.
57. Escalante A, Brey RL, Mitchell BD, Jr., Dreiner U. Accuracy of anticardiolipin antibodies in identifying a history of thrombosis among patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1995; 98: 559-565.
58. Abreu J, Pierangeli SS, Harris EN. Comparison of three assays for the detection of antiphospholipid and anti-β2 glycoprotein I antibodies. *Lupus* 1998; 7: S211 [Abstract].
59. Harris EN, Pierangeli SS. A more specific ELISA assay for the detection of antiphospholipid antibodies. *Clin Immunol Newslett* 1995; 15: 26-28.
60. Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, Harris EN, Polisson RP. Comparison between the standard anticardiolipin antibody test and a new phospholipid test in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1999; 26: 591-596.
61. Santiago M, Martinelli R, Ko A, Reis EA, Fontes RD, Nascimento EG, et al. Anti-beta2 glycoprotein I and an-

- ticardiolipin antibodies in leptospirosis, syphilis and Kala-azar. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 425-430.
62. **Wilson WA, Charavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al.** International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.
  63. **Nash MJ, Camilleri RS, Kunka S, Mackie IJ, Machin SJ, Cohen H.** The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1077-1081.
  64. **Kaplan V, Erkan V, Derksen W, Sammaritano L, Pierangeli S, Roubey R.** Real world experience with antiphospholipid antibodies (APL): how useful is anti-Beta2 glycoprotein I (β2GPI) test? . *Arthritis Rheum* 2004; S67 [Abstract].
  65. **Harris EN, Pierangeli SS.** 'Equivocal' antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15: 81-85.
  66. **Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR.** The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 993-997.
  67. **Krnic-Barrie S, O'Connor CR, Looney SW, Pierangeli SS, Harris EN.** A retrospective review of 61 patients with antiphospholipid syndrome. Analysis of factors influencing recurrent thrombosis. *Arch Intern Med* 1997; 157: 2101-2108.
  68. **Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, et al.** A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med* 2003; 349: 1133-1138.
  69. **Finazzi G, Marchioli R, Branchaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, et al.** A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost* 2005; 3: 848-853.
  70. **Erkan D, Yazici Y, Peterson MG, Sammaritano L, Lockshin MD.** A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 924-929.
  71. **García DA, Khamashta MA, Crowther MA.** How we diagnose and treat thrombotic manifestations of the antiphospholipid syndrome: a case-based review. *Blood* 2007; 110: 3122-3127.
  72. **Erkan D, Harrison MJ, Levy R, Peterson M, Petri M, Sammaritano L, et al.** Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2382-2391.
  73. **Rubenstein E, Arkfeld DG, Metyas S, Shinada S, Ehresmann S, Liebman HA.** Rituximab treatment for resistant antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 2006; 33: 355-357.



Islas Galápagos, Ecuador. 2008  
**Carlos A. Lozano M.**