

La prolongación del tiempo de protrombina diluido (dTP) a baja concentración de iones calcio no identifica a todos los anticoagulantes lúpicos (AL) asociados a anticuerpos anti β_2 glicoproteína I ($a\beta_2$ GPI)

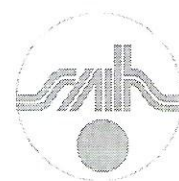
Marta E. Martinuzzo¹, Graciela S. Cerrato¹, Yolanda P. Adamczuk¹,
María L. Iglesias Varela¹, Ricardo R. Forastiero^{1,2}

¹Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Fundación Favalaro,
Buenos Aires, Argentina

²Universidad Favalaro, Buenos Aires, Argentina

Correspondencia: Dra. Marta E Martinuzzo, Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Instituto de Cardiología y cirugía Cardiovascular, Fundación Favalaro
Belgrano 1746 1er Subsuelo. Hematología - 1093 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54)(11)4378-1311 - TE: (54)(11) 4378-1349
e-mail: hemato@ffavaloro.org - martinuzzo@fibertel.com.ar

Fecha de recepción: 1/3/07
Fecha de aceptación: 7/3/07



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 10 N° 3: 88-92
Septiembre-Diciembre, 2006

RESUMEN

En la literatura se describió que la prolongación de las pruebas de coagulación a baja concentración de iones calcio se asociaba a la presencia de $a\beta_2$ GPI en un pequeño grupo seleccionado de pacientes con anticoagulante lúpico (AL). Por ello se decidió evaluar la respuesta a la disminución en la concentración de calcio de los plasmas obtenidos de 318 pacientes consecutivos derivados a nuestro laboratorio para la investigación de AL. Se realizó el tiempo de protrombina diluido (dTP) utilizando una dilución 1:50 de tromboplastina recombinante a 2 concentraciones finales de calcio 15 y 5 mM. Se calculó el cociente P:N a ambas concentraciones y luego una relación de esos cocientes (razón 5:15). Setenta y cinco de 318 presentaron AL positivo. De los mismos, aquellos que presentaban $a\beta_2$ GPI prolongaban significativamente el dTP a bajas concentraciones de calcio: media de cocientes P:N 2.43 vs 2.96 a 15 y 5 mM respectivamente, $p=0.05$. Una prolongación mayor del 20% (razón 5:15 >1.2) se presentó en el 47.7% de los pacientes con AL (+) y $a\beta_2$ GPI (+) comparado con un 16.2% de los pacientes AL (+) $a\beta_2$ GPI (-), $p=0.0014$. Se observó que la presencia de $a\beta_2$ GPI estaba asociada a la prolongación del dTP a bajas concentraciones de iones calcio, no obstante la sensibilidad de la prueba para identificar los AL asociados a $a\beta_2$ GPI es baja.

Palabras claves: anticoagulante lúpico, anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I, tiempo de protrombina diluido, bajas concentraciones de calcio.

INTRODUCCIÓN

El anticoagulante lúpico (AL) se caracteriza por la prolongación de ensayos de coagulación que dependen de fosfolípidos¹. El mismo constituye un factor de riesgo para el desarrollo de trombosis tanto venosa como arterial², y uno de los criterios de laboratorio para el diagnóstico de Síndrome anti-fosfolípido (SAF)³. No obstante el AL no es específico; puede deberse a la presencia de anticuerpos dirigidos contra β_2 glicoproteína I ($a\beta_2$ GPI) o protrombina humana (aPT), y ser positivo aún en ausencia de estos anticuerpos detectados por ELISA. También se lo encontró asociado a situaciones clínicas como neoplasias, determinadas drogas, o algunas infecciones como lepra o SIDA⁴.

A los $a\beta_2$ GPI se los ha encontrado más relacionados a las manifestaciones clínicas de SAF que los anticuerpos anticardiolipina (aCL) o los aPT, por lo que se lo considera mejor marcador patogénico de este síndrome^{5,6}. Es por ello, que recientemente algunos investigadores han realizado algunos esfuerzos para tratar de desarrollar pruebas de laboratorio para que nos permitan identificar los AL dependientes de $a\beta_2$ GPI⁷⁻⁹.

El Dr. Pengo y colaboradores⁹ demostraron a través de un ensayo en 2 etapas que los plasmas de diez

pacientes con AL y $\alpha\beta_2$ GPI (+) prolongaban el tiempo de veneno de víbora de Russel diluido (dRVVT) y el tiempo de protrombina diluido (dTP) cuando disminuía la concentración final de iones calcio de 10 a 5 mM. Por el contrario, en los diez plasmas AL (+) pero $\alpha\beta_2$ GPI (-) los tiempos de coagulación en las mismas condiciones se acortaban.

El objetivo del presente estudio fue investigar en forma sistemática los efectos que provoca la disminución de la concentración de iones calcio en el dTP de todos los pacientes derivados a nuestro laboratorio para la detección de AL en un período de 18 meses para evaluar su utilidad para la identificación de los AL asociados a $\alpha\beta_2$ GPI. Además se trató de evaluar la asociación de esta prueba con la presencia de aPT.

PACIENTES

Se estudiaron 318 pacientes consecutivos (149 hombres y 169 mujeres, media de edad: 41.9 años) entre junio de 2004 y diciembre 2005, que fueron derivados para la evaluación de trombofilia o para la presencia de anticuerpos antifosfolípidos debido a que cursaban una condición clínica asociada al SAF. Setenta y cinco (32 hombres y 43 mujeres, media de edad: 47.1 años) presentaron un resultado positivo para AL.

De ellos 44 reunían los criterios actualmente vigentes para SAF desde la Reunión de Sydney en el SCC on Lupus Anticoagulant and phospholipid dependent antibodies³: 16 pacientes con historia de trombosis venosa, 15 de trombosis en territorio arterial y 3 con historia de trombosis en ambos territorios. Trece de las 43 mujeres tenían historia de complicaciones obstétricas, incluyendo muerte fetal y abortos a repetición. Los 31 pacientes que no reunían criterios de SAF presentaban las siguientes situaciones clínicas asociadas: 2 leucopenia, 3 trombocitopenia, 5 lupus eritematoso sistémico (LES) o un cuadro lupus like, 3 neoplasia, 1 livedo reticularis, 3 síntomas neurológicos, 2 infecciones, 6 mujeres que tenían historia de menos de 3 abortos y 3 asintomáticos.

Como grupo control para determinar los rangos de referencia de los cocientes a cada concentración de calcio se utilizaron 100 plasmas de individuos sanos comparables en edad y sexo.

MÉTODOS

La presencia de AL fue evaluada siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis¹. Como pruebas de detección se utilizaron: Tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) con PTT LA (Diagnostica Stago,

Asnieres, France), dRVVT con veneno de Víbora Russell (Diagnostica Stago) y cefalina mezcla de Bell & Anton diluida 1:4, dTP como un ensayo combinado con tromboplastina recombinante Innovin (Dade Behring, Marburg, Germany) diluida 1:500 con 25 mM CaCl_2 y sin dilución (10), y tiempo de coagulación con Kaolin (KCT) utilizando una suspensión de 2% kaolin en agua destilada.

El ensayo de dTP a 2 concentraciones de iones calcio se realizó con Innovin diluido 1:50 en CaCl_2 a una concentración final de 15 y 5 mM. Se calculó el cociente paciente: normal (P:N) de cada plasma a ambas concentraciones de calcio, y además se calculó una razón adicional entre los cocientes obtenidos a las 2 concentraciones de calcio (razón 5:15) con el objetivo de evaluar la prolongación producida por la disminución en la concentración de calcio.

Los aCL de isotipo IgG e IgM se dosaron utilizando un ELISA desarrollado basado en un método estándar¹¹. Los $\alpha\beta_2$ GPI IgG e IgM fueron determinados a través de un ELISA que utilizó β_2 GPI humana como antígeno pegada a la superficie de placas de poliestireno irradiadas por rayo de electrones a 100 kg¹². Los aPT IgG e IgM fueron realizados por ELISA que utilizó protrombina humana como antígeno pegado a placas irradiadas con radiación γ ¹³.

RESULTADOS

Los valores de corte (percentilo 90) del dTP expresado como cociente P:N a cada una de las concentraciones de iones calcio en el grupo control normal fue de 1.15 para calcio 15mM y 1.37 para calcio 5 mM, mientras que la razón 5:15 fue 1.20. La media de los cocientes P:N se incrementó significativamente cuando la concentración de calcio disminuyó de 15 (2.43) a 5 mM (2.96) en plasmas con AL(+) y $\alpha\beta_2$ GPI(+), $p=0.05$. Contrariamente, la misma disminuyó significativamente en el grupo de plasmas LA(+) $\alpha\beta_2$ GPI(-) 1.74 vs. 1.39, a 15 y 5 mM respectivamente, $p=0.005$. La media de razones 5:15 fue significativamente más elevada en los pacientes AL (+) con $\alpha\beta_2$ GPI positivos comparados con los negativos (Tabla I). Por el contrario, la presencia de aPT no se asoció a prolongaciones del dTP al disminuir la concentración de calcio. Más aún, los plasmas aPT(+) presentaron una tendencia a acortar los tiempos de coagulación del dTP: cociente P:N 2.09 vs 1.83, $p=NS$, para 15 y 5 mM respectivamente (Figura 1). Cuando ambos anticuerpos fueron evaluados en conjunto, la presencia aPT pareció disminuir las razones 5:15 (tabla I). El grado de prolongación del dTP a baja concentración de calcio correlacionó de manera estadísticamente significativa con los títulos de $\alpha\beta_2$ GPI IgG ($r=0.370$, $p=0.001$) y $\alpha\beta_2$ GPI IgM ($r=0.346$, $p=0.02$).

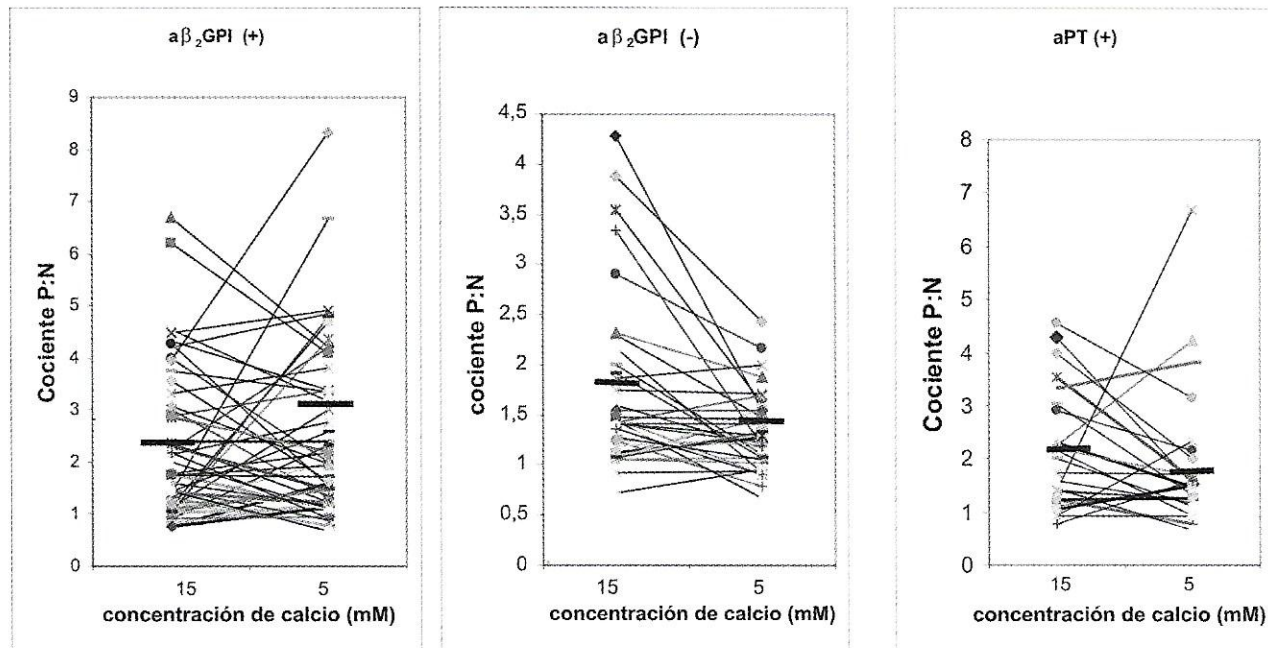


Figura 1: Se observan los cocientes P:N del tiempo de protrombina diluido (dTP) a las dos concentraciones de calcio evaluadas. Abreviaturas: aβ2GPI (anticuerpos anti β2 Glicoproteína I), aPT (anticuerpos antiprotrombina). Las barras gruesas indican las medias de los cocientes P:N.

TABLA I
Prolongación del dTP a bajas concentraciones de calcio.
Razón de dTP 5:15 en la población AL (+)

	n	Razón 5:15	p	Prevalencia de la razón 5:15 >1.20(%)	p
aβ2GPI (+)	38	1.60		47.4	
aβ2GPI (-)	37	0.89	<0.001	16.2	0.0014
aPT (+)	26	0.99		23.1	
aPT (-)	49	1.31	0.123	36.7	0.30
aβ2GPI (+) aPT (+)	12	1.23		41.7	0.06 *
aβ2GPI (+) aPT (-)	26	1.63	0.043	50	0.034 *
aβ2GPI (-) aPT (+)	15	0.83		13.3	
aβ2GPI (-) aPT (-)	22	0.96		18.2	

* vs. aβ2GPI (-) aPT (-)
Abreviaturas: aβ2GPI (anticuerpos anti β2 Glicoproteína I), aPT (anticuerpos antiprotrombina)

El 20.7% de los 233 pacientes AL (-) y el 32% de los 75 AL (+) evaluados presentaron una prolongación mayor al 20% cuando se disminuía la concentración de iones calcio (razón 5:15 >1.20), p= 0.05. La presencia de una razón 5:15 mayor a 1.20 se halló claramente asociada a la de aβ2GPI: 47.4% en los aβ2GPI (+) vs. 16.2% en los aβ2GPI (-) p =0.0014.

No se observó asociación estadística entre la positividad de esta prueba y la presencia o los títulos de aCL (datos no mostrados). La prolongación de esta prueba no se halló asociada a la historia de trombosis de los pacientes AL (+): 32.3% vs. 31.7% en aquellos con o sin historia de trombosis respectivamente. Tampoco se asoció con la presencia de mani-

festaciones clínicas de SAF: positiva en el 31.8% de los pacientes que cumplían criterios de SAF vs. 32.4% de los que no.

DISCUSIÓN

Debido a las evidencias de que el AL es un importante factor de riesgo para trombosis venosa y arterial², y a que los $\alpha\beta_2$ GPI se asocian fuertemente a las manifestaciones clínicas de SAF^{5,6}, se han realizado esfuerzos recientemente para desarrollar pruebas que traten de identificar aquellos AL dependientes de $\alpha\beta_2$ GPI⁷⁻⁹.

Simmelink y col⁷ intentaron identificar este tipo de AL y demostraron que la prolongación del APTT podía ser neutralizada con vesículas conteniendo cardiolipina (CL). Por su parte, en las mismas condiciones experimentales las vesículas de CL prolongaban los APTT de los AL dependientes de aPT. En un trabajo más extenso⁸, el mismo grupo de investigadores mostró que esta prueba podía identificar a los AL dependientes de $\alpha\beta_2$ GPI y que su positividad estaba asociada a las manifestaciones clínicas de SAF en pacientes con LES. Sin embargo, en un estudio multicéntrico más reciente¹⁴ que incluía un grupo mucho más grande de pacientes no se pudo confirmar la observación previa y actualmente se están haciendo modificaciones en la composición del reactivo, particularmente en la concentración de iones magnesio, con el objetivo de mejorar la respuesta del ensayo.

El Dr. Pengo y col. realizaron un trabajo muy interesante⁹ en el que evaluando un grupo pequeño de pacientes seleccionados con AL (+), demostraron que la disminución de la concentración de calcio en el dTP y el dRVVT provocaban una prolongación de los tiempos de coagulación sólo en aquellos con $\alpha\beta_2$ GPI. Más aún, ellos demostraron que este mismo efecto se lograba cuando a un plasma normal se le agregaba un anticuerpo $\alpha\beta_2$ GPI purificado por columnas de afinidad. El efecto observado podría deberse a una mayor deposición de los complejos de β_2 GPI - $\alpha\beta_2$ GPI sobre los fosfolípidos presentes en el reactivo, compitiendo y o reduciendo la unión de los factores de coagulación a los mismos. De hecho, ha sido probado que a baja concentración de calcio la afinidad de la β_2 GPI por los fosfolípidos se ve incrementada y más aún en presencia del anticuerpo específico. Por otra parte, la unión de la β_2 GPI a fosfolípidos inmovilizados no se afecta por la concentración de calcio pero la de los factores de coagulación como es de mayor afinidad sí se ve afectada por una disminución en la misma, más aún cuando la superficie fosfolípida está parcialmente cubierta de β_2 GPI.

En el presente trabajo usamos el dTP a concentraciones finales de calcio estándar y disminuidas (15 and 5 mM) en un grupo consecutivo (no seleccionado) de pacientes derivados a nuestro laboratorio para la búsqueda de AL. Nosotros pudimos confirmar los estudios del Dr. Pengo en cuanto a la asociación de una prolongación del tiempo de dTP a través de la razón 5:15 significativamente más elevada en los pacientes AL (+) con $\alpha\beta_2$ GPI. Demostramos también que el grado de prolongación del dTP correlacionaba con los títulos de $\alpha\beta_2$ GPI. Pudimos observar además que la presencia de aPT tiende a acortar los tiempos de coagulación de la prueba a bajas concentraciones de calcio tanto en pacientes con o sin $\alpha\beta_2$ GPI. La presencia de aPT aislada o asociada a $\alpha\beta_2$ GPI no había sido evaluada en el artículo del Dr. Pengo. A pesar del hallazgo de esta asociación entre la prolongación de los tiempos y la presencia de $\alpha\beta_2$ GPI, la sensibilidad de esta prueba para identificar plasmas AL (+) asociados a $\alpha\beta_2$ GPI detectados por ELISA es baja (47.5%).

Un hallazgo interesante es que existen algunos plasmas AL (+) de pacientes con $\alpha\beta_2$ GPI que presentaban tiempos normales en el dTP realizado rutinariamente en nuestro laboratorio (tromboplastina diluida 1:500 a una concentración final de calcio 15mM), pero presentaban prolongación de la prueba sólo cuando la concentración de calcio estaba disminuida.

Analizando manifestaciones clínicas de SAF y trombótica en particular, no hallamos ninguna asociación entre las mismas y la positividad de esta prueba. Esto puede deberse a la baja sensibilidad para la misma observada en esta extensa población no seleccionada de pacientes.

Por lo tanto concluimos, que en los plasmas AL (+) la presencia de $\alpha\beta_2$ GPI se asoció a la prolongación del dTP a bajas concentraciones de calcio. No obstante, esta prueba no permitió identificar a todos los pacientes AL (+) $\alpha\beta_2$ GPI (+). Consideramos que ésta es una prueba fácil de realizar y de bajo costo que puede ser utilizada de manera complementaria ya que es capaz de identificar algunos pacientes con AL asociado a $\alpha\beta_2$ GPI.

ABSTRACT

Low calcium concentration in the diagnosis of lupus anticoagulant with anti β_2 glycoprotein I antibodies.

The presence of lupus anticoagulant (LA) is a risk factor for thrombosis and unexplained repeated abortion or fetal death. Anti β_2 Glycoprotein I antibodies ($\alpha\beta_2$ GPI) have been recognized as an important marker of the antiphospholipid syndrome. In a

selected and reduced number of patients it has been shown that the prolongation of coagulation tests for LA by lowering calcium concentration was associated to the presence of a β_2 GPI.

We evaluated the response of plasmas from 318 consecutive patients referred for LA investigation by lowering calcium concentration. Dilute prothrombin time (dPT) was performed with 1:50 dilution of recombinant thromboplastin at two calcium final concentrations 15 and 5 mM. P:N ratios were calculated at each concentration and then a ratio of 5:15 was performed. Seventy five of the 318 were LA(+). In those LA(+)a β_2 GPI (+) dPT were significantly prolonged at lower calcium concentration (mean P:N ratio 2.43 vs. 2.96 at 15 and 5 mM respectively, $p=0.05$). The prevalence of a prolongation more than 20% (5:15 ratio >1.20) was 47.4% vs. 16.2% in a β_2 GPI (+) and (-) respectively $p=0.0014$. We showed that a β_2 GPI were associated with a prolongation of dPT when calcium concentration is low, but the sensitivity of this test is not enough to identify all LAs associated with a β_2 GPI detected by ELISA.

Key words: lupus anticoagulant, anti β_2 glycoprotein I antibodies, dilute prothrombin time, low calcium concentration

BIBLIOGRAFÍA

1. Brandt JT, Triplett DA, Alving B y col. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant: an update. **Thromb Haemost** 1995; 74: 1185-90.
2. Galli M, Luciani D, Bertolini G y col. Lupus anticoagulants are stronger risks factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. **Blood** 2003; 10: 1827-32.
3. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T y col. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). **J Thromb Haemost** 2006; 4: 295-306.
4. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? **J Autoimmun** 2000; 15: 163-72.
5. Galli M, Luciani D, Bertolini G y col. Anti β_2 glycoprotein I, anti prothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. **Blood** 2003; 102: 2717-23.
6. Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G y col. A prospective study of antibodies to β_2 -glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis. **J Thromb Haemost** 2005; 3: 1231-8.
7. Simmelink MJ, Derksen RH, Arnout J y col. A simple method to discriminate between β_2 -glycoprotein I and prothrombin dependent lupus anticoagulants. **J Thromb Haemost** 2003; 1: 740-7.
8. de Laat HB, Derksen RH, Urbanus RT y col. β_2 -glycoprotein I dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. **Blood** 2004; 104: 3598-602.
9. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C y col. A two-step coagulation test to identify anti beta-glycoprotein I lupus anticoagulants. **J Thromb Haemost** 2004; 2: 702-7.
10. Forastiero RR, Cerrato GS, Carreras LO. Evaluation of recently described tests for detection of the lupus anticoagulant. **Thromb Haemost** 1994; 72: 728-33.
11. Harris EN. The Second International Anticardiolipin Standardization Workshop/The Kingston Antiphospholipid Antibody (KAPS) Study Group. **Am J Clin Pathol** 1990; 94: 476-84.
12. Martinuzzo M, Forastiero R, Carreras LO. Anti β_2 -glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. **Br J Haematol** 1995; 89: 397-402.
13. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, y col. Relationship of anti β_2 -glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. **Thromb Haemost** 1997; 78: 1008-14.
14. de Groot PG. SSC-mediated multicentre study on the predictive value of a β_2 GPI specific LAC assay for the detection of a risk for thrombosis. **Minutes and Annual Reports Scientific Subcommittees of the Scientific and Standardization Committee International Society on Thrombosis and Haemostasis. Sidney, Australia** 2005.