

# Anticuerpos antifosfolípidos y proteína Z

**Palabras clave:** Anticuerpos antifosfolípidos, proteína Z  
**Key words:** Anti-phospholipidic antibodies, protein Z

**Recibido:** 07/06/2001  
**Aceptado:** 30/06/2001

B. Stéfano de Perdomo,\* R. Forastiero,\*\* M. Martinuzzo,\*\* L. Kordich \*\*\*

\* Centro de Estudios e Investigación de Hemostasis y Trombosis (CEDIHT), Montevideo, Uruguay.

\*\* Universidad Favaloro. Buenos Aires. República de Argentina

\*\*\* Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. República de Argentina.

## Resumen

La proteína Z (PZ) constituye una proteína plasmática, vitamina K dependiente. Se une a trombina, promoviendo la unión de ésta a las vesículas fosfolípicas, uniéndose además por sí misma a estas superficies en presencia de calcio. Medimos la concentración de PZ plasmática, en pacientes con anticuerpos antifosfolípidos (aFL). Se estudiaron 53 pacientes con aFL, a 33 de ellos se les dosificó, además de la PZ, anticuerpos antiprotrombina (anti-II) y antibeta 2 glicoproteína 1 (ab2GP1). El grupo testigo estaba constituido por 36 sujetos normales. Los pacientes con aFL, presentaron niveles disminuidos de PZ, con una significancia estadística de  $p < 0.0001$ . Los niveles de PZ se encontraron disminuidos, independientemente de la presencia o ausencia de anti-II o antibeta 2 glicoproteína 1. Concluimos que los pacientes con aFL presentan niveles plasmáticos de PZ reducidos, sin relacionarse con la especificidad antigénica de los anticuerpos antifosfolípidos. Es aún desconocido si esta alteración puede deberse a una acelerada depuración de la proteína, a inhibición de su síntesis o a la presencia de anticuerpos específicos anti-PZ.

## Summary

Protein Z (PZ) constitutes a plasmatic protein, vitamin K dependent. It joins thrombin, promoting its link to phospholipidic vesicles, getting joined by itself to these surfaces in the presence of calcium. We have measured plasmatic PZ concentration in patients with anti-phospholipidic (aPL) antibodies. 53 patients with aPL were studied, 33 of them were given, besides PZ, antiprotrombin antibodies (anti-II) and antibeta 2 glycoprotein 1 (ab2GP1). The test group was composed by 36 normal people. Patients with aPL presented diminished levels of PZ, with a statistical significance of  $p < 0.0001$ . Levels of PZ were found to be diminished, apart from the presence or absence of anti-II or antibeta 2 glycoprotein. We conclude that patients with aPL present decreased levels of plasmatic PZ, without any relationship with antigenic specificity of antiphospholipidic antibodies. It is already unknown if this alteration may be due to a quick protein depuration, to its synthesis inhibition or to specific anti-Pz antibodies presence.

## Introducción

**E**l síndrome antifosfolípido (SAFL) representa una entidad que se manifiesta como trombosis arteriales o venosas, pérdidas fetales recurrentes, junto a resultados de laboratorio que muestran la presencia de anticuerpos contra complejos, fosfolípidos aniónicos-proteínas.<sup>6</sup>

El concepto de heterogeneidad de los anticuerpos en el síndrome antifosfolípido (SAFL) es bien conocido. Se dividen en dos grupos: a) relacionados con infecciones y b) autoanticuerpos, que reconocen una variedad de proteínas que se unen a fosfolípidos, por lo que se denominan anticuerpos anticomplejos fosfolípidos-proteínas. La beta2GP1 y la protrombina humana son las pro-

teínas más involucradas en la unión de los aFL, con las superficies fosfolípicas. Otras proteínas vitamino-K dependientes, como las proteínas C y S, han sido propuestas como antígenos potenciales para los aFL.

Los aFL son detectados por su reactividad frente a fosfolípidos aniónicos o complejos proteínas-fosfolípidos por enzoinmunoensayo de fase sólida, o por su inhibición de las pruebas de coagulación fosfolípidos dependiente, esta prueba es conocida como efecto de anticoagulante lúpico.<sup>5</sup>

La proteína Z humana constituye una proteína-vitamina K dependiente, de PM 50 000 D. Con vida media de dos a siete días. Su estructura es homóloga a la de los factores II, VII, IX y X, así como a la de las proteínas C y S. Promueve la unión de la trombina a las superficies fosfolípicas de una manera calcio-dependiente.<sup>4</sup> También sirve como cofactor para la inhibición del factor Xa por el inhibidor de proteasa PZ-dependiente.<sup>3</sup> Es sensible a la acción de la alfa-trombina, conociéndose además su interacción con la fosfatidilserina y fosfatidilcolina, así como con la prostaciclina E1. Se encuentra presente en las lesiones vasculares ateroscleróticas.

## Material y métodos

Se estudiaron 53 pacientes (14 hombres y 39 mujeres), cuyas edades oscilaron entre los 26 y 53 años, con una media de 38 años. Veintinueve de ellos presentaron anticuerpos anticardiolipina (aCL) y anticoagulante lúpico (AL), 17 sólo resultaron con aCL y siete sólo con AL. En 33 pacientes se evaluaron, anticuerpos antiprotrombina (anti-II) y antibeta 2 glicoproteína 1. El grupo testigo estaba constituido por 36 sujetos normales (10 hombres y 26 mujeres) de 32 a 56 años.

De los 53 pacientes, 12 tenían Lupus eritematoso diseminado (LES), 40 presentan SAFL (32 trombosis, 12 pérdidas fetales y 13 pacientes tenían aFL), pero no tenían clínica de SAFL (*cuadro I*).

**Cuadro I. Población.**

Datos clínicos		Datos de laboratorio	
N	53	AL	36
Edad media	38 años	aCL	46
Hombre/Mujer	14/39	aBETA2GP1	20/33
LES	12	ANTI-II	14/33
*SAFL	40		
Trombosis	32		
Pérdida fetal recurrente	12		
*No SAFL	13		

## Muestra

Sangre con citrato 0.109M, de acuerdo con el hematocrito. Doble centrifugación. 3 000 rpm durante 20 minutos cada una, hasta lograr recuento plaquetario menor de 5 000/ $\mu$ L. Freezada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, descongelando a  $37^{\circ}\text{C}$ .

## Métodos

Para el diagnóstico de AL se utilizaron como prueba de *screening*: APTT con PTT-LA (Stago), prueba de veneno diluido de víbora Russell, dRVVT, con DVV (American diagnostic) y tiempo de protrombina con tromboplastina (Innovin, DADE) diluida 1:500. Ensayo de mezclas en proporciones 1:1 y 4:1. Como prueba confirmatoria: prueba de neutralización plaquetaria, prueba de veneno concentrado de víbora Russell con DVV confirm (American Diagnostic).

Para la detección de aCL se utilizó método estándar de ELISA, para los isotipos IgG e IgM. Resultados positivos:  $> 10$  UGPL (IGG) y  $> 10$  UMPL (IgM).<sup>2</sup>

En el caso de detección de a $\beta$ 2GP1 se utilizó ELISA estandarizado, usando beta 2 GP1 purificada (Stago) a una concentración de 2  $\mu$ g/pocillo y placas Nunc (Nunc MaxiSorp) irradiadas a 100 kGy.<sup>6</sup>

En la detección de anti-II se utilizó ELISA estandarizado, empleando protrombina purificada (Stago), a una concentración de 1  $\mu$ g/pocillo y placas Nunc (NuncMaxiSorp), gamma irradiadas.<sup>1</sup>

Respecto de la cuantificación de PZ se utilizó técnica de ELISA, en soporte sólido sensibilizado por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> proveniente de un anticuerpo monoclonal antiproteína Z. (Asserachrom Protein Z, Diagnóstica Stago.) Valor cut-off: 1.51 µg/mL.

En lo que se refiere al análisis estadístico, los resultados se expresaron en valores medios y su correspondiente intervalo de confianza del 95%. La comparación de dos grupos se realizaron mediante el método de t-test para muestras no apareadas. El método de ANOVA, *one way*, se utilizó para la comparación de más de dos grupos y el procedimiento de Benferroni para la comparación múltiple. Se consideró significación estadística con una P < 0.05. Se usó el software SPSS (versión 7.5 para Windows).

## Resultados

El grupo de pacientes con aFL, presentó niveles disminuidos de PZ (media e intervalo de confianza del 95%), 2.04 µg/mL (1.85-2.23), en comparación con el grupo testigo, 2.71 µg/mL (2.51-2.91); P < 0.0001. Esta disminución de la PZ se observó en los pacientes aCL y AL positivos (*cuadro II*).

Relacionando nivel de PZ en grupo testigo *versus* pacientes con AL+, se encontraron valores para estos últimos de 1.95 µg/mL (1.64-2.16), P < 0.001 y cuando se compara el grupo testigo con aCL+, el valor obtenido es de 2.05 µg/mL (1.83-2.27) con una significación estadística: P < 0.001.

El nivel de PZ en los 33 pacientes a quienes se les estudió la anti-II y la aβ<sub>2</sub>GP1, fue entre 1.70-2.23 µg/mL con una mediana de 2.0. En los anti-II positivos la mediana fue de 1.9 µg/mL (1.44-2.49) y en los anti-II negativos, la mediana fue de 2.1 µg/mL (1.66-2.27). De esto último se deduce que el descenso de la PZ en estos pacientes no está relacionado con la presencia o no de los anti-II (p: ns), mientras que sí tienen alta significación estadística cuando se compara la PZ del grupo testigo *versus* PZ en anti-II positivo, *versus* anti-II negativo

**Cuadro II.**

	Normales PZ(ug/mL)	aFL(+) PZ(ug/mL)	aCL(+) PZ(ug/mL)	AL(+) PZ(ug/mL)
Número	36	53	46	36
Valor mínimo	1.2	0.5	0.5	0.5
Mediana	2.71	2.04	2.05	1.95
Valor máximo	3.7	3.7	3.7	3.7
95% IC Medio	2.51-2.91	1.85-2.23	1.83-2.27	1.64-2.16

Grupo control vs aFL+: p < 0.0001.

Grupo control vs AL +: p < 0.001.

Grupo control vs ACL+: p < 0.001

(P = 0.0001), 1.96 µg/mL (1.44-2.49) y 1.97 µg/mL (1.66-2.27) respectivamente (*cuadro III*).

De acuerdo con estos resultados, concluimos que los pacientes con aFL, presentan niveles plasmáticos de PZ reducidos, sin que esto último tenga relación con la especificidad antigénica de los aFL.

## Discusión

El rol de las superficies fosfolípicas en la activación de la coagulación es fundamental. Es imprescindible su presencia para la activación del factor X y IX, por el complejo FT-VII, la activación del factor X, por los factores VIII y IX y la activación del factor II por los factores X y V. La presencia de aFL, reduce la cantidad de fosfolípidos disponibles para que se

**Cuadro III.**

	Normales Pz ug/mL	aFL+ PZ ug/mL	Anti-II(+) y/o aB2GP1+y/o PZ ug/mL	Anti-II(-) aB2GP1(-) PZ ug/mL
Número	36	33	20	13
Valor mínimo	1.2	0.5	0.5	1.1
Mediana	2.8	2.0	2.0	2.1
Valor máximo	3.7	3.7	3.7	3.35
95% IC Medio	2.51-2.91	1.70-2.23	1.57-2.42	1.6-2.16

Normales vs Anti-II (+) y/o aB2GP1 p = 0.0001

Normales vs Anti-II (-) y/o aB2GP1 p = 0.0001

Anti-II (+) y/o aB2GP1 (+) vs Anti-II y/o aB2GP1 (-): p = ns

realicen las reacciones mencionadas, interfiriendo en el mecanismo de la coagulación. El alto grado de homología estructural de la PZ, con los factores II, VII, X, proteínas C y S, hace pensar en un rol importante de la misma en la hemostasis. Se une a la trombina promoviendo la unión de ésta a vesículas fosfolípídicas, uniéndose además por sí misma a estas superficies en presencia de calcio.

La especificidad antigénica de los anticuerpos antifosfolípidos se identifica mediante la unión de éstos a proteínas, formando un complejo fosfolípido-proteína. Las proteínas más involucradas en estos complejos son la  $\beta$ 2GP1 y la anti-II.

Debido a la estrecha relación de la PZ con los fosfolípidos y la trombina, nuestro objetivo fue medir los niveles de PZ en pacientes con aFL y evaluar sus variaciones, en pacientes con diferentes subclases de anticuerpos antiproteína-fosfolípidos: anti- $\beta$ 2GP1 y anti-II.

En los resultados obtenidos se encuentra una disminución franca de PZ en pacientes con aFL, sin relacionarse con su especificidad antigénica. Esta alteración puede deberse a una acelerada de-

puración de la proteína, a una inhibición de su síntesis o a la presencia de anticuerpos específicos anti-PZ, o anticuerpos anti complejo FL-PZ.

Hemos diseñado futuros estudios para tratar de dilucidar estas hipótesis.

## Referencias

1. Forastiero R, Martinuzzo M, Serrato G, Kordich L, Carreras L. Relation of anti-B2GP1 and anti prothrombin antibody to thrombosis and pregnancy loss in patients with anti-prothrombin antibodies. *Thromb and Haemost* 1997; 78: 1008-1015.
2. Harris E. The second international anticardiolipin standarization workshop the Kingston Antiphospholipid Antibody Study (KAPS Group). *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 476-484.
3. Ham X, Fielher R, Broze G Jr. Interaction of protein Z dependent plasma proteasa inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (16): 9250-9255.
4. Hogg P, Stanflo J. Interaction of vitamin K-dependent protein Z with thrombine. *J Biol Chem* 1999; 274 (17): 10953-10958.
5. Martinuzzo M, Forastiero R, Carreras L. Antibeta 2 Glicoprotein 1 Antibodies: Detection and association with thrombosis. *Br J of Haem* 1995; 89: 397-402.
6. Rand Jacob, Xiao-Xuan Wu. *Thromb and Haemost* 1999; 82 (2): 669-655.
7. Stéffano de Perdomo B. El Síndrome antifosfolipídico. *Tendencias* 1997; (11): 61-68.