

Reconocimiento a la trayectoria de la Prof.^a Dra. Lucía C. Kordich

Acción de los anticuerpos antifosfolípidos sobre los mecanismos inhibitorios del factor X activado

Posible mecanismo fisiopatológico del síndrome antifosfolípido

Effect of antiphospholipid antibodies on activated factor X inhibition

Potential physiopathologic mechanism of the antiphospholipid syndrome

► Ricardo Raúl Forastiero^{1*,**}, Marta Elba Martinuzzo^{1*}

1. Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

* Servicio de Hematología, Hemostasia y Trombosis, Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Fundación Favaloro.

** Universidad Favaloro, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El síndrome antifosfolípido es una enfermedad autoinmunitaria que se define por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) en el plasma de pacientes con complicaciones trombóticas tanto en territorio venoso como arterial y/o con morbilidad obstétrica. Los mecanismos patogénicos que han sido propuestos para los aFL se pueden agrupar en dos categorías: 1) efectos inhibitorios sobre los sistemas antitrombóticos fisiológicos y 2) efectos que conducen a la activación celular. En esta revisión se presentan los datos de la acción de los aFL sobre los mecanismos inhibitorios del factor X activado, especialmente lo relacionado al sistema del inhibidor de la vía del factor tisular y del sistema proteína Z e inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z.

Palabras clave: anticuerpos antifosfolípidos * síndrome antifosfolípido * proteína Z * inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z * inhibidor de la vía del factor tisular

Summary

The antiphospholipid syndrome is an autoimmune disease defined by the presence of antiphospholipid antibodies (aPL) in patients with venous and/or arterial thrombosis, and/or obstetric morbidity. There are two groups of aPL-related pathogenic mechanisms: 1) inhibitory effects on the physiologic antithrombotic systems and 2) induction of cellular activation. In the present update the findings on the aPL interference on the activated factor X inhibition are presented. In particular, the aPL effects on the tissue factor pathway inhibitor, and the protein Z/ protein Z dependent protease inhibitor system.

Key words: antiphospholipid antibodies * antiphospholipid syndrome * protein Z * protein Z dependent protease inhibitor * tissue factor pathway inhibitor

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

SISTEMA DE COAGULACIÓN Y FUNCIONES DEL FACTOR X

El proceso de coagulación de la sangre puede ser dividido en tres etapas que son las de iniciación, amplificación y propagación (Fig. 1). Es iniciado por el complejo que forma el factor tisular (FT) (receptor celular transmembrana) con el factor VII activado (a), el cual se forma en los sitios de injuria vascular (1) (2). El FT expresado por las células del subendotelio de las venas o en el núcleo rico en lípidos de la placa aterosclerótica es expuesto cuando la capa endotelial es dañada y denudada. Este FT expuesto es capaz de unirse a pequeñas cantidades de VIIa que se hallan fisiológicamente en plasma. El FT expresado en los monocitos o en las micropartículas celulares también puede ser el iniciador en los sitios donde no hay endotelio denudado, a través de la interacción mediada por el receptor de la glicoproteína P selectina (PSGL-1) en la superficie de los leucocitos o en las micropartículas derivadas de ellos y la P selectina expresada en la superficie de las células endoteliales activadas. En los casos en que la injuria endotelial es suficiente como para inducir activación y agregación plaquetaria, una tercera forma de expresión de FT se produce como resultado de la unión de las micropartículas expresando FT a la P se-

lectina de la superficie de plaquetas activadas. Independientemente de su origen, el FT que toma contacto con la circulación al unirse al factor VIIa forma un complejo llamado “tenasa extrínseco” que activará al factor IX y al X, siendo esta última activación la más eficiente. El factor Xa formado convierte pequeñas cantidades de protrombina en trombina (IIa). Estas bajas concentraciones de trombina, generadas directamente por el factor Xa, son suficientes para activar los factores V y VIII (cofactores esenciales del sistema de coagulación), plaquetas y el factor XI unido a la superficie plaquetaria (etapa de amplificación).

De esta manera se inicia el proceso de propagación en el que el factor IXa se une al factor VIIIa en la superficie de las plaquetas activadas y forman el complejo “tenasa intrínseco” que activa el factor X formando factor Xa con mayor eficiencia que en la etapa de iniciación. Este factor Xa y el Va presente en la superficie de las plaquetas activadas forman el complejo enzimático protrombinasa que convierte protrombina en trombina. La activación del factor XI unido a las plaquetas por la trombina genera, además, cantidades mayores de Xa con la consecuente generación de grandes cantidades de trombina, etapa conocida como tormenta de trombina, que llevará a la generación de fibrina a partir del fibrinógeno, paso final del proceso. La trombina activa, además, el factor XIII que produce el entrecruzamiento y la estabilización de la malla de fibrina (3) (4).

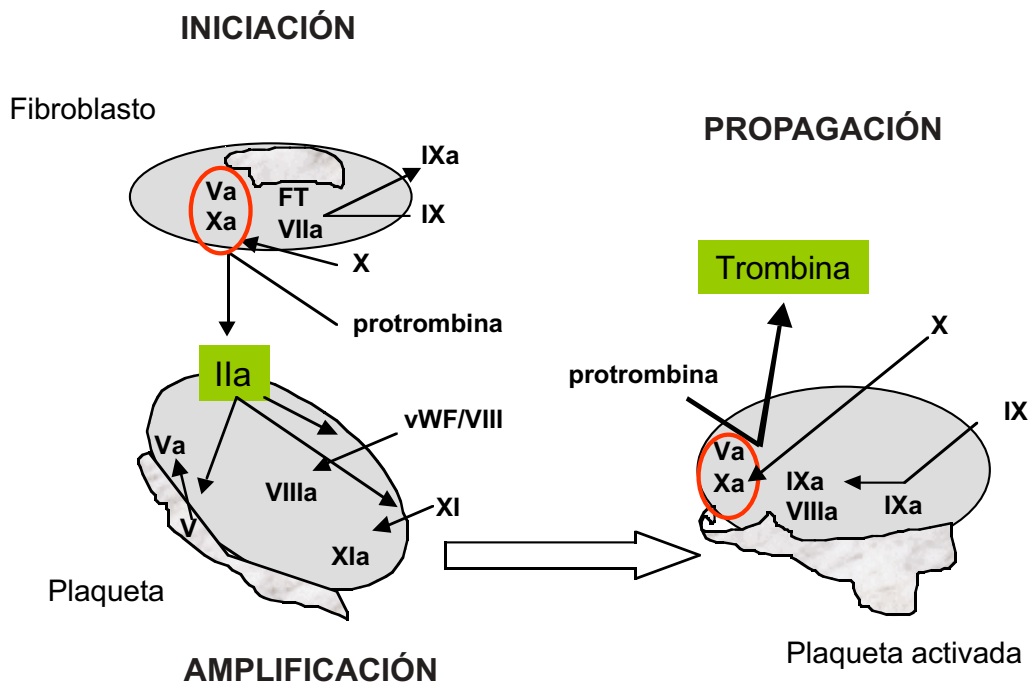


Figura 1. Esquema de las etapas de la activación del mecanismo de coagulación.

MECANISMOS INHIBITORIOS NATURALES DEL FACTOR Xa

Dentro de los inhibidores del factor Xa (serinoproteasa) se encuentra principalmente la serpina anti-trombina (AT). Pero existen además otros sistemas inhibitorios fisiológicos que tienen importancia, como el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y el sistema conformado por la proteína Z (PZ) y el inhibidor de proteasas dependiente de PZ (ZPI).

Sistema de la Proteína Z

La PZ es un miembro del sistema de coagulación conocido desde hace varios años pero cuya función ha sido dilucidada más recientemente (5) (6). Es una glicoproteína plasmática de 62 kDa dependiente de vitamina K. Tiene una vida media en plasma de aproximadamente 2.5 días. Actúa como cofactor de la inactivación del factor Xa por el ZPI. Junto con la AT y el TFPI juega un rol crucial en el control de los niveles del factor Xa. El ZPI es una proteína de 72 kDa que pertenece a la superfamilia de serpinas de inhibidores de proteasas pero que contiene un residuo de tirosina en su sitio reactivo (7-9). La PZ circula formando un complejo con el ZPI (10). Este inhibidor es capaz de inhibir el Xa en presencia de fosfolípidos (FL) y Ca^{2+} , pero la velocidad de esta inhibición se incrementa hasta 1000 veces en presencia de PZ. La heparina no tiene efecto en la velocidad de reacción en presencia de PZ, pero sí la incrementa en ausencia de PZ. Hay evidencias de que en el proceso inhibitorio se formaría un complejo estequiométrico de PZ-ZPI-Xa en la superficie fosfolipídica. El ZPI no tiene efecto sobre IIa, meizotrombina, VIIa, IXa, XIIa, kalicreína, proteína C activada (APC), plasmina, tripsina, etc. el XIa, no obstante, es inactivado por el ZPI en una reacción que no requiere PZ, FL, ni Ca^{2+} . La actividad de ZPI es consumida durante la coagulación a través de la proteólisis mediada por el complejo PZ-Xa y por XIa.

Los niveles de PZ se incrementan rápidamente durante el primer mes de vida, pero ese incremento se hace más lento durante la infancia, alcanzándose los valores de adulto en la pubertad. Ha sido confirmado por varios estudios que el rango de valores de PZ plasmática hallado en la población sana (450 personas) es muy amplio (entre 0,6 y 5,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con una media de 2,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en plasma citratado (11). Circula unida al ZPI y en condiciones normales de exceso de ZPI, toda la PZ está unida. Los niveles de ZPI también presentan un rango amplio de 33-191% en la población normal. Se encontró además correlación entre los niveles de PZ y de ZPI. El déficit de vitamina K y el tratamiento con anticoagulantes orales disminuye la concentración de PZ y el grado de carboxilación, pero no afecta los niveles de ZPI. Las mujeres que ingieren anticonceptivos orales presentan niveles de PZ y ZPI superiores a las que no los reciben.

Esto puede ser explicado tan sólo en parte por las publicaciones preliminares que sugerían que la PZ tenía un comportamiento de reactante de fase aguda, aunque algunos polimorfismos genéticos del intrón A y F estudiados recientemente podrían influir en la concentración plasmática de PZ (12-15).

Se ha excluido el rol de los polimorfismos genéticos de la PZ como factor de riesgo para tromboembolismo venoso. Estudios recientes han mostrado que la deficiencia de PZ influencia el fenotipo protrombótico tanto en modelos animales con factor V Leiden como en pacientes con factor V Leiden (16) (17). Existen resultados contradictorios en lo que se refiere a la asociación de los niveles disminuidos de PZ en pacientes con infarto cerebral (18-22). Se ha hallado además una asociación entre los niveles disminuidos de PZ y las pérdidas de embarazo por causas inexplicables (23). Los niveles de PZ varían durante el embarazo normal, observándose un incremento del 20% desde el primer trimestre al momento del parto (como respuesta al incremento concomitante de factores), disminuyendo un 30% entre las 6-12 semanas post parto (24).

Vía del TFPI

El TFPI es un regulador clave del proceso de coagulación inducido por el FT (25). Ejerce su efecto neutralizando la actividad catalítica del factor Xa y produciendo un *feed-back* negativo sobre el complejo FT-VIIa en presencia de Xa. Debido a un *splicing* alternativo del ARN mensajero existen dos formas proteicas: el TFPI α y β . El TFPI α es una glicoproteína soluble de 46 kDa, que contiene una región ácida N-terminal seguida por dominios tipo Kunitz (K) 1 y 2 que son responsables de la unión del TFPI al complejo FT-VIIa y al Xa, respectivamente. Completan la molécula un dominio K3 que no tiene actividad inhibitoria y el extremo C-terminal que está involucrado en su localización en la superficie celular, además de jugar un papel importante en el TFPI α secretado.

El TFPI β es una forma en la que el dominio K3 y el C-terminal son reemplazados por una región C-terminal no relacionada que genera la unión de una cadena de glicosilfosfatidilinositol (GPI). El TFPI β (28 kDa) es más pequeño que el α (30 kDa) pero en gel de SDS poliacrilamida ambas formas migran con una masa molecular similar (46 kDa), lo cual sugiere diferencias en las modificaciones post-translacionales, siendo el TFPI β el de mayor glicosilación. El endotelio es la principal fuente de TFPI, y una fracción del TFPI producido por las células endoteliales y la placenta se mantiene asociada a la membrana. La heparina es capaz de liberar TFPI del *pool* intracelular sin afectar el unido a membrana. Tanto el TFPI α como el β permanecen unidos a las membranas a través del GPI presente en el C-terminal del TFPI β , o a través de proteínas

ricas en GPI para el α . Ni el ARN mensajero ni los niveles de proteína de ambas formas se ven afectados por estímulos inflamatorios *in vitro*. Si bien el TFPI α es el que predomina en la superficie celular (80%), el β unido es el responsable de la mayoría de la actividad inhibitoria sobre el complejo FT-VIIa (26).

SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmunitaria que se define por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) en el plasma de pacientes con complicaciones tromboticas tanto en territorio venoso como arterial y/o con morbilidad obstétrica (abortos a repetición, muerte fetal, retardo del crecimiento intrauterino, eclampsia) (27)(28). Recientemente el consenso de expertos ha actualizado los criterios clínicos y de laboratorio para diagnosticar este síndrome (29)(30). Los aFL en el plasma de pacientes pueden ser detectados como actividad de anticoagulante lúpico (AL) a través de la prolongación de pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos o a través de ensayos en fase sólida como los ELISAs para anticuerpos anticardiolipina (aCL) o anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI). Para el diagnóstico de SAF se requiere que los aFL sean demostrados en al menos 2 oportunidades con un período no menor a 12 semanas entre ambas evaluaciones del laboratorio. Los aCL y/o anti- β_2 GPI de isotipo IgG y/o IgM deben estar presentes en títulos moderados o altos (30).

Especificidad antigénica

A partir de los años 90 se identificó a la β_2 GPI como el cofactor proteico indispensable para expresar la actividad de aCL *in vitro* (31-33). Esta proteína pertenece a la superfamilia de proteínas que controlan el complemento y posee 5 dominios Sushi ubicándose el epítipo que reconoce los anti- β_2 GPI presentes en los pacientes con SAF fundamentalmente en el dominio I de la molécula (34), mientras que los de pacientes con aFL pero sin complicaciones clínicas tromboembólicas reconocen epítipos ubicados en los restantes 4 dominios (II, III, IV y V).

El ensayo de aCL puede detectar aFL inducidos por diferentes infecciones o por ciertas drogas. Entre las infecciones se encuentran sífilis, lepra, tuberculosis, fiebre Q, VIH, citomegalovirus, HCV, virus de Epstein-Barr, parvovirus, Kala-Azar, leptospirosis, etc (35-37). Los aFL asociados a infecciones son generalmente transitorios pero en algunos casos persisten por largo tiempo. Algunos investigadores han tratado de evaluar si existen diferencias entre los aFL autoinmunes, presentes en el SAF y en diferentes desórdenes autoinmunes, y aquellos inducidos por infecciones o drogas. Varias características inmunológicas han sido evaluadas: reactividad con CL u otros fosfolípidos aniónicos o

neutros, reactividad con mezclas de fosfolípidos, subclases de IgG y grados de afinidad entre los antígenos y los aFL. Los principales hallazgos de estos estudios son: los aFL autoinmunes presentan reactividad cruzada con la mayoría de los FL aniónicos, son de subclase IgG₂ y persisten en forma crónica. Por el contrario, los aFL relacionados a infecciones reaccionan preferentemente con CL, son de subclase IgG₁ e IgG₃ y se presentan en forma transitoria. Otra de las características diferenciales es que las infecciones como sífilis y VIH no se acompañan de la actividad de AL, la cual se asocia frecuentemente a los aCL en pacientes con SAF o enfermedades autoinmunes.

Se demostró que la unión de los aFL autoinmunes a CL era incrementada en presencia de β_2 GPI (aFL dependientes de β_2 GPI) mientras que la de los aFL de infecciones (sífilis) era inhibida (aFL independientes de β_2 GPI) (33). Estos hallazgos fueron confirmados en otros estudios al evaluar otras infecciones (VIH) y también al estudiar la reactividad de aFL purificados (IgG, IgM e IgA). Los aFL inducidos por drogas, en cambio, se comportan inmunológicamente como los aFL autoinmunes. Las conclusiones de esos estudios indican que los aCL autoinmunes reaccionan con epítipos del complejo CL- β_2 GPI y los de infecciones con la molécula de CL. La importancia de la β_2 GPI ha sido también reconocida por los estudios que indican que los aCL pueden unirse a la proteína en ausencia del fosfolípido (38)(39). Sin embargo, esto ocurre solamente cuando la β_2 GPI se presenta bajo ciertas condiciones experimentales, como inmovilización sobre superficies de poliestireno irradiadas u oxidadas o en altas concentraciones antigénicas como en ensayos de *Western* o *Dot blot* (40). Esto se debe a que son anticuerpos de baja afinidad y requieren unirse de manera bivalente. Algunos anti- β_2 GPI también tienen actividad de AL (41). La protrombina es otro de los blancos antigénicos de algunos aFL con actividad de AL y también es frecuente encontrar anticuerpos contra protrombina (anti-PT) en pacientes con aFL del tipo autoinmune (42). Los anti-PT se asemejan a los anti- β_2 GPI en las condiciones del ensayo necesarias para su detección (40). Los anti-PT se clasifican en dos tipos: 1) funcionales cuando se relacionan a la actividad de AL y 2) no funcionales cuando se detectan por ELISA pero no expresan actividad de AL. Varias proteínas con alta afinidad por los FL han sido también descritas como blancos antigénicos de estos anticuerpos: proteína S, proteína C, anexina A5, TFPI, activador tisular del plasminógeno (tPA), inhibidor del tPA (PAI-1), plasminógeno, receptor endotelial de proteína C (EPCR), factores de coagulación XII, XI y VII etc, aunque sólo se han hallado frecuentemente y se les ha adjudicado un rol fisiopatológico relevante a la β_2 GPI y a la protrombina (43). No existen hasta el momento pruebas de laboratorio únicas e indiscutibles para el diagnóstico de SAF (44). El SAF es

un síndrome particular ya que las manifestaciones clínicas que lo caracterizan son muy frecuentes en la población general y la única forma de diagnosticarlo es a través de la positividad de las pruebas serológicas o de coagulación que forman parte de los criterios de laboratorio del SAF.

En estudios más recientes se evaluaron otras enfermedades infecciosas como lepra, parvovirus, etc. Existen varias publicaciones sobre aFL en lepra y en la mayoría se indica la alta frecuencia de aCL en las infecciones crónicas con *Mycobacterium leprae*. En algunos de esos estudios se demostró que había heterogeneidad de los aCL en lo referente a la dependencia o no de β_2 GPI. En un trabajo reciente se estudiaron 51 pacientes con lepra y se encontró una frecuencia muy alta de aFL (45). El 69% tenía fuerte actividad de AL y el 61% presentaba títulos muy elevados de aCL. Estos eran predominantemente de isotipo IgM. Además, el 57% tenía anti- β_2 GPI y el 43% anti-PT. Los títulos de anti- β_2 GPI eran muy elevados y el isotipo más frecuente fue IgM. La principal conclusión es que los aFL presentes en ambas entidades clínicas (SAF y lepra) comparten las mismas características inmunológicas pero difieren en el isotipo de inmunoglobulina. Es principalmente IgG en SAF e IgM en lepra. En un estudio publicado recientemente se demostró que el *test* de Rubino que se usa para el diagnóstico de lepra es en realidad una reacción entre los fosfolípidos de los glóbulos rojos con β_2 GPI e IgM de los pacientes con lepra. Los autores encontraron además que este *test* daba positivo en el 45% de los pacientes con SLE y aFL. Estos datos confirman los hallazgos de la similitud entre los aFL de ambas enfermedades. Más recientemente se demostró además que los anti- β_2 GPI de isotipo IgG en lepra eran de subclase IgG₁ e IgG₃, a diferencia de los hallados en el SAF que son principalmente IgG₂. Los de lepra presentan alta afinidad por la β_2 GPI y los de SAF baja afinidad (46). Parecen diferir además en el epítipo que reconocen ya que los de SAF reaccionan fundamentalmente con el dominio I de la β_2 GPI y los de lepra o de pacientes con aFL pero sin complicaciones clínicas tromboembólicas reconocen epítipes ubicados en los restantes 4 dominios de la proteína (47-56).

Mecanismos fisiopatológicos

El SAF forma parte del grupo de entidades donde los fenómenos tromboticos son mediados por autoanticuerpos. Teniendo en cuenta que los fosfolípidos y las proteínas que unen fosfolípidos tienen un papel crucial en el mantenimiento de la hemostasia y están involucrados en una variedad de funciones celulares se postularon varios mecanismos patogénicos de los aFL (57) (58). Es desconocido aún el origen de la respuesta inmune que lleva a la producción de los autoanticuerpos presentes en los pacientes con SAF. Una hipótesis

sugiere que la exposición permanente de superficies procoagulantes, generadas como consecuencia de activación o daño celular, podría inducir la unión de ciertas proteínas plasmáticas con alta afinidad por los fosfolípidos aniónicos y de esta manera estos complejos se comportarían como inmunógenos. Existen varias evidencias que indican que los aFL no sólo son marcadores sino que también contribuyen al desarrollo de las complicaciones clínicas ya mencionadas (28). Otra hipótesis plantea la posibilidad de que infecciones virales o bacterianas subclínicas puedan inducir la producción de aFL. Se demostró que ciertos agentes infecciosos contienen péptidos de unión a fosfolípidos con similitud estructural al sitio de unión a fosfolípidos presente en la β_2 GPI. Hay evidencias muy recientes de que normalmente existen células B de memoria con capacidad de sintetizar aFL que ante la inducción de ciertos agentes infecciosos o ambientales incrementan la síntesis y los niveles plasmáticos de los aFL. Los mecanismos patogénicos que han sido propuestos para los aFL se pueden agrupar en dos categorías: 1) efectos inhibitorios sobre los sistemas antitrombóticos fisiológicos y 2) efectos que conducen a la activación celular. La Tabla I muestra los mecanismos fisiopatológicos más estudiados. A continuación y como principal objetivo de esta actualización se detallan los datos de la literatura que avalan la acción de los aFL sobre los mecanismos inhibitorios naturales del factor Xa.

Tabla I. Potenciales mecanismos fisiopatológicos del síndrome antifosfolípido

Acción sobre los sistemas antitrombóticos fisiológicos

- Inhibición de la actividad de la proteína C activada
- Inhibición de la activación de la proteína C por parte del EPCR
- Interferencia sobre la actividad inhibitoria del TFPI
- Interferencia sobre la actividad inhibitoria del sistema ZPI/PZ
- Inhibición de la activación del plasminógeno por parte del tPA
- Inhibición de la activación de la antitrombina
- Disminución de la concentración plasmática de la proteína S

Activación celular

- Estimulación de la síntesis del tromboxano plaquetario
- Disminución de la síntesis de prostaciclina endotelial
- Estimulación de la biosíntesis de la P-selectina plaquetaria
- Incremento de la biosíntesis no enzimática de isoeicosanoides
- Aumento en la síntesis y expresión del FT en membranas de monocitos y células endoteliales
- Estimulación de la biosíntesis y expresión de moléculas de adhesión de células endoteliales
- Remoción de anexina A5 de las superficies celulares
- Aumento de la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias

Interferencia sobre la acción del sistema PZ/ZPI

Los aFL también interfieren con la actividad del ZPI, un sistema antitrombótico que regula los niveles de factor Xa en una reacción rápida (Fig. 2). En 2003, se demostró que la β_2 GPI tiene un efecto moderado sobre la inactivación *in vitro* del factor Xa por parte del sistema ZPI/PZ (59). Este efecto es probablemente debido a que la PZ se une lentamente a los FL aniónicos y por lo tanto la inactivación del Xa por ZPI/PZ es atenuada por la unión de la β_2 GPI a las mismas superficies fosfolipídicas. La actividad inhibitoria del ZPI sobre el factor Xa se encontró muy disminuida *in vitro* en presencia de β_2 GPI y de IgG purificadas de pacientes con aFL autoinmunes. De tal manera se postuló que los complejos aFL/ β_2 GPI potenciarían la acción modesta que la β_2 GPI ejerce sobre este sistema como resultado de que los complejos muestran mayor afinidad por los FL que la β_2 GPI sola. En experimentos en ausencia de esta proteína, la actividad del sistema ZPI/PZ no se modificó en presencia de los aFL.

La eficacia de la acción del sistema ZPI/PZ es dependiente de la concentración plasmática de PZ y en estudios publicados en 2001 (en colaboración con la Dra Kordich y la Dra. Stefano de Perdomo) se presentaron los primeros hallazgos de una alta frecuencia de niveles de PZ disminuidos en pacientes con aFL (60). Se encontró que el 21% de la población de pacientes con aFL estudiados tenían deficiencia de PZ antigénica. Esta deficiencia adquirida fue corroborada en estudios de otros autores. Los datos fueron también confir-

mados en el estudio caso-control de 2003 donde se encontró que el 18.2% del grupo total de 66 pacientes con aFL tenían PZ disminuida comparado con 4.6% del grupo de 152 controles sanos. Esta diferencia fue aún más significativa en pacientes con SAF (24%) pero no en aquellos pacientes con aFL pero sin historia de complicaciones clínicas (10%). Los niveles antigénicos de ZPI no fueron diferentes entre los pacientes con aFL y el grupo control normal. En otro estudio se evidenció, además, que la deficiencia de PZ en pacientes con aFL autoinmunes se asociaba a un riesgo 7 veces mayor de trombosis arterial (59). El mecanismo de la deficiencia de PZ en relación a la presencia de aFL no se conoce aún pero considerando que los aFL modifican la biosíntesis y la expresión celular de moléculas de adhesión, FT y citoquinas, los aFL podrían quizás interferir en la síntesis o secreción de la proteína.

Interferencia sobre la acción de la vía del TPF1

La generación de factor Xa por parte del FT en presencia de aCL autoinmunes fue evaluada en un estudio reciente, en el que se demostró que las fracciones IgG purificadas de los aCL y de los anti- β_2 GPI suprimen la actividad anti-Xa del TFPI y como consecuencia se incrementa la generación de Xa por el FT (61). El efecto no se observó cuando la fracción IgG total era depleta de la actividad anti- β_2 GPI o cuando el plasma normal donde se realizaba el experimento *in vitro* era depletado de β_2 GPI o de TFPI. La hipótesis presentada indica que los complejos β_2 GPI/anti- β_2 GPI compiten con los com-

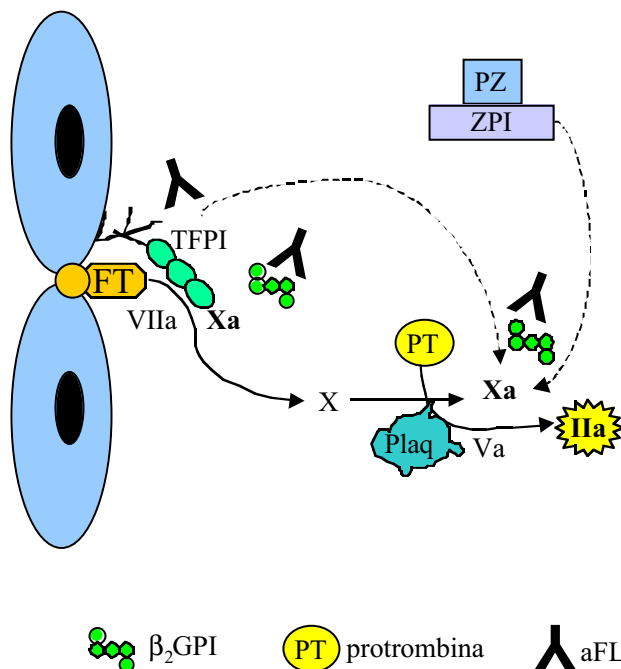


Figura 2. Acción de los aFL autoinmunes sobre los mecanismos antitrombóticos que controlan la actividad del factor Xa.

plejos TFPI/factor Xa por las mismas superficies fosfolípidicas y de esa manera interfieren con la función normal del TFPI. Otros datos indican además que los pacientes con aFL autoinmunes tienen frecuentemente anticuerpos anti-TFPI y que los títulos altos de estos anticuerpos se asocian a las complicaciones clínicas del SAF (62). El 33% de una población de 162 pacientes con aFL persistentes en el tiempo presentó anti-TFPI IgG y/o IgM. Aquellos con diagnóstico de SAF tenían una frecuencia de 38% y aquellos con aFL pero sin complicaciones clínicas, una prevalencia de 28%. Un hallazgo estadísticamente más significativo fue que los títulos altos de anti-TFPI fueron más prevalentes en pacientes con SAF que en aquellos sin SAF (18% vs. 6%). En estudios *in vitro* se pudo demostrar que las IgG purificadas con actividad anti-TFPI interfieren con la actividad inhibitoria del TFPI sobre el factor Xa y por lo tanto esta enzima podría permanecer más tiempo en circulación con capacidad de generar más trombina (Fig. 2). Este efecto no se observó en ausencia de FL aniónicos. La mayoría de los aFL reconocieron la molécula entera del TFPI pero no la forma truncada en la que le falta el dominio K3 y el extremo C-terminal. Esto podría indicar que el epítipo de los anticuerpos estaría localizado en la región involucrada en la interacción del TFPI con las superficies celulares. Todos estos hallazgos son consistentes con un estudio funcional que demuestra una disminución de la actividad del TFPI en pacientes con SAF y por consiguiente un incremento muy significativo de la generación de factor Xa y trombina (63).

En el estudio inicial de anticuerpos anti-TFPI se encontró que la presencia de títulos altos de anti-TFPI en mujeres con títulos altos de aFL autoinmunes parece incrementar el riesgo de complicaciones obstétricas relacionadas a los aFL (62). Recientemente se evaluó retrospectivamente un grupo de 243 mujeres con historia de complicaciones tempranas o tardías de embarazos y se encontró que los anti-TFPI estaban presentes en el 37% de las mujeres con aFL y solamente en el 1% de las mujeres sin aFL o controles sanos (64). En este último estudio, confirmando datos previos, los títulos altos de anti-TFPI fueron más frecuentes en pacientes con SAF que en controles sanos (14% vs. 0%). Esto indicaría que los anti-TFPI podrían ser un factor de riesgo adicional a la presencia de aFL autoinmunes en lo referente a la morbilidad obstétrica.

En los pacientes con aFL asociados a infecciones la presencia de anticuerpos con especificidad contra proteínas que tienen alta afinidad por fosfolípidos difiere en infecciones del grupo de sífilis, VIH, hepatitis, etc, con respecto a infecciones tipo lepra lepromatosa. En un trabajo reciente se estudió la presencia de anti-TFPI en un grupo de 90 pacientes con diferentes infecciones (65). Los anti-TFPI se hallaron en sólo 4 de los 56 pacientes con aFL asociados a infecciones. En ningún caso los anti-TFPI fueron de título alto como es

posible hallar en pacientes con SAF. Estos anticuerpos son por consiguiente raramente encontrados en pacientes con infecciones, aún en lepra que sí presenta títulos muy altos de anti- β_2 GPI y/o anti-PT.

Conclusión

Dentro de la fisiopatogenia del SAF las alteraciones demostradas por distintos autores en la vía del FT conforman uno de los mecanismos de mayor relevancia (28) (57) (58) (66). Hay consenso en que los pacientes con SAF presentan incremento de la síntesis, expresión y actividad del FT en el endotelio y los monocitos. Esto, junto a la disminución de la actividad de los sistemas antitrombóticos (TFPI y PZ/ZPI), generaría un estado hipercoagulable debido al incremento de actividad del factor Xa y a la generación de trombina. Esto explicaría el estado protrombótico observado en pacientes con SAF pero no en aquellos con infecciones como lepra, y está en concordancia con la evidencia de un aumento *in vivo* de los marcadores solubles de activación de coagulación en los pacientes con SAF (67) (68).

CORRESPONDENCIA

DR. RICARDO RAÚL FORASTIERO

Universidad Favaloro - Hematología

Solis 453

C1078 AAI CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES. Argentina

E-mail: forastiero@favaloro.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. Rao LVM, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signalling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 47-56.
2. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1015-22.
3. Monroe DM, Hoffman M. What does it make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 41-8.
4. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood* 2005; 106: 2605-12.
5. Broze GJ Jr. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 8-13.
6. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ. Protein Z. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 551-6.
7. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9250-5.
8. Al-Shanqeeti A, Vlieg AvH, Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJr. Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2005; 93: 411-3.
9. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000; 96: 3049-55.

10. Tabatabai A, Fiehler R, Broze GJ Jr. Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 85: 655-60.
11. Miletich JP, Broze GJ Jr. Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarin therapy. *Blood* 1987; 69: 1580-6.
12. Santacroce R, Capucci F, Di Perna P, Sessa F, Margaglione M. Protein Z gene polymorphisms are associated with protein Z plasma levels. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1197-9.
13. Souiri M, Koseki-Kuno S, Iwata H, Kemkes-Matthes B, Ichinose A. A naturally occurring E30Q mutation in the Gla domain of protein Z causes its impaired secretion and subsequent deficiency. *Blood* 2005; 105: 3149-54.
14. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ, Souiri M, Koseki-Kuno S, Ichinose A. R255H amino acid substitution of protein Z identified in patients with factor V Leiden. *Br J Haematol* 2004; 128: 248-52.
15. Van de Water N, Tan T, Ashton F, O'Grady A, Day T, Browett P, *et al.* Mutations within the protein Z-dependent protease inhibitor gene are associated with venous thromboembolic disease: a new form of thrombophilia. *Br J Haematol* 2004; 127: 190-4.
16. Yin ZF, Huang ZF, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsburg D, *et al.* Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6734-8.
17. Kemkes-Matthes B, Nees M, Kühnel G, Matzdorff A, Matthes KJ. Protein Z influences the prothrombotic phenotype in factor V Leiden patients. *Thromb Res* 2002; 106: 183-5.
18. Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 2001; 357: 933-4.
19. Heeb MJ, Paganini-Hill A, Griffin JH, Fisher M. Low protein Z levels and risk of ischemic stroke: differences by diabetic status and gender. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 139-44.
20. Kobelt K, Demarmels Biasiutti FD, Mattle HP, Lämmle B, Willemin WA. Protein Z in ischaemic stroke. *Br J Haematol* 2001; 114: 169-73.
21. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Czlonkowska A, Kuczynska-Zardzewialy A. Protein Z in young survivors of ischemic stroke. *Thromb Haemost* 2002; 88: 536.
22. Martinelli I, Razzari C, Biguzzi E, Bucciarelli P, Mannucci PM. Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2817-9.
23. Gris JC, Quéré I, Dechaud H, Mercier E, Pincon C, Hoffet M, *et al.* High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early fetal loss. *Blood* 2002; 99: 2606-8.
24. Loetscher KCQ, Stiller R, Roos M, Zimmermann R. Protein Z in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 2005; 93: 706-9.
25. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74: 90-3.
26. Piro O, Broze GJ. Comparison of cell-surface TFPI α and β . *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2677-83.
27. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome. Ten years on. *Lancet* 1993; 342: 341-4.
28. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346: 752-63.
29. Wilson W, Gharavi A, Koike T, Lockshin M, Branch W, Piette J, *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Report of an International Workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-11.
30. Miyakis S, Lockshin D, Atsumi T, Branch D, Brey R, 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.
31. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, *et al.* Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-7.
32. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krillis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4.
33. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa T, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336: 177-8.
34. Bas de Laat H, Derksen RHW, de Groot PG. β 2 glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 2004; 112: 161-8.
35. de Larrañaga G, Forastiero RR, Carreras LO, Alonso B. Different types of antiphospholipid antibodies in AIDS. A comparison with syphilis and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 1999; 96: 19-25.
36. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Kordich LC, Carreras LO. Reactivity to β 2 glycoprotein I clearly differentiates anticardiolipin antibodies from antiphospholipid syndrome and syphilis. *Thromb Haemost* 1996; 75: 717-20.
37. Santiago M, Martinelli R, Ko A, Reis EA, Fontes RD, Nascimento EG, *et al.* Anti- β 2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in leptospirosis, syphilis and Kala-azar. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 425-30.
38. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize β 2-glycoprotein I structure altered by interacting with oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179: 457-62.
39. Roubey RAS, Eisenberg RA, Harper MF, Winfield JB. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize β 2-Glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of antigen density and bivalent binding. *J Immunol* 1995; 154: 954-60.
40. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Carreras LO. Binding properties of antibodies to prothrombin and β 2-glycoprotein I assayed by ELISA and Dot blot. *Clin Exp Immunol* 1999; 118: 480-6.
41. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-32.
42. 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 anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1120-5.
43. Forastiero R, Martinuzzo M. Antigen specificity and clinical relevance of antiphospholipid syndrome-related autoantibodies. *Curr Rheumatol Rev* 2005; 1: 177-87.
 44. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun* 2000; 15: 163-72.
 45. de Larrañaga G, Forastiero RR, Martinuzzo ME, Carreras LO, Tsariksian G, Sturno MM, *et al.* High prevalence of antiphospholipid antibodies in leprosy: evaluation of antigen reactivity. *Lupus* 2000; 9: 594-600.
 46. Arvieux J, Renaudineau Y, Mane I, Perraut R, Krilis SA, Youinou P. Distinguishing features of anti- β_2 glycoprotein I antibodies between patients with leprosy and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2002; 87: 599-605.
 47. Martinuzzo M, Forastiero R, Carreras LO. Anti β_2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995; 89: 397-402.
 48. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, Kordich LC, Carreras LO. 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.
 49. 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 1000 patients. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1019-27.
 50. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciaverella N, Mazzucconi MG, Schinco PC, *et al.* Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian registry. *Am J Med* 1996; 100: 530-6.
 51. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors of thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 2003; 101: 1827-32.
 52. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti- β_2 -glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102: 2717-23.
 53. Zanon E, Saggiorato G, Ramon R, Girolami A, Pagnan A, Prandoni P. Anti-prothrombin antibodies as a potential risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2004; 91: 255-8.
 54. Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L, *et al.* A prospective study of antibodies to β_2 glycoprotein I and prothrombin and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1231-8.
 55. Cabral AR, Amigo MC, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. The antiphospholipid/cofactor syndromes: a primary variant with antibodies to β_2 -glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assays. *Am J Med* 1996; 101: 472-81.
 56. Gris JC, Perneger TV, Quéré I, Mercier E, Fabbro-Peray P, Lavigne-Lissalde G, *et al.* Antiphospholipid/antiprotein antibodies, hemostasis-related autoantibodies, and plasma homocysteine as risk factors for a first early pregnancy loss: a matched case-control study. *Blood* 2003; 102: 3504-13.
 57. Carreras LO, Forastiero RR. Pathogenic role of antiprotein-phospholipid antibodies. *Haemostasis* 1996; 26: 340-57.
 58. de Groot PG, Derksen RH. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1854-60.
 59. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze GJ. Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by protein Z / protein Z dependent protease inhibitor. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1764-70.
 60. Steffano B, Forastiero R, Martinuzzo M, Kordich L. Low plasma protein Z levels in patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinol* 2001; 12: 411-2.
 61. Salemink I, Blezer R, Willems GM, Galli M, Bevers E, Lindhout T. Antibodies to β_2 -glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2000; 84: 653-6.
 62. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Broze GJ Jr. High titers of autoantibodies to tissue factor pathway inhibitor are associated with the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 718-24.
 63. Adams M, Breckler L, Stevens P, Thom J, Baker R, Oostryck R. Anti-tissue factor pathway inhibitor activity in subjects with antiphospholipid syndrome is associated with increased thrombin generation. *Haematologica* 2004; 89: 985-90.
 64. Martinuzzo M, Iglesias Varela ML, Adamczuk Y, Broze GJ, Forastiero R. Antiphospholipid antibodies and antibodies to tissue factor pathway inhibitor in women with implantation failures or early and late pregnancy losses. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2587-9.
 65. Forastiero RR, Martinuzzo ME, de Larrañaga G, Broze GJ. Antibodies to tissue factor pathway inhibitor are uncommonly detected in patients with infection-related antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2250-1.
 66. Dobado-Berrios P, López-Pedraza C, Velasco F, Cuadrado MJ. The role of tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2467-76.
 67. Forastiero RR, Martinuzzo ME, de Larrañaga G. Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy-related antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2005; 14: 129-36.
 68. Martinuzzo ME, de Larrañaga GF, Forastiero RR, Pelegrí Y, Fariña MH, Alonso BS, *et al.* Markers of platelet, endothelial cell and blood coagulation activation markers in leprosy patients with antiphospholipid antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 477-83.

Aceptado para su publicación el 21 de julio de 2006

