

Tesis de Posgrado

Autoanticuerpos anti-beta2 glicoproteína I y anti-protrombina humana. Su rol en la fisiopatología del síndrome antifosfolípido

Forastiero, Ricardo Raúl

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Forastiero, Ricardo Raúl. (1997). Autoanticuerpos anti-beta2 glicoproteína I y anti-protrombina humana. Su rol en la fisiopatología del síndrome antifosfolípido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2937_Forastiero.pdf

Cita tipo Chicago:

Forastiero, Ricardo Raúl. "Autoanticuerpos anti-beta2 glicoproteína I y anti-protrombina humana. Su rol en la fisiopatología del síndrome antifosfolípido". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2937_Forastiero.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

***"AUTOANTICUERPOS ANTI-B₂ GLICOPROTEINA I
Y ANTI-PROTROMBINA HUMANA.
SU ROL EN LA FISIOPATOLOGIA DEL SINDROME
ANTIFOSFOLIPIDO"***

Ricardo Raúl Forastiero

Universidad de Buenos Aires

1997

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

"Autoanticuerpos anti- β_2 glicoproteína I y anti-protrombina humana. Su rol en la fisiopatología del síndrome antifosfolípido"

Autor

Ricardo Raúl Forastiero

Director de Tesis

Prof. Dra. Lucía C. Kordich

Lugar del Trabajo de Tesis

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y Departamento de Hematología del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Fundación Favaloro, Buenos Aires, Argentina.

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1997

AGRADECIMIENTOS

- ⇒ Deseo expresar mi más sincera gratitud a mi directora de tesis la Dra. Lucía Kordich por invitarme a preparar esta tesis bajo su supervisión. En especial por permitirme la posibilidad de compartir sus amplios conocimientos en el campo de la hemostasia y trombosis, por sus consejos y permanente estímulo en el trabajo. Me siento muy afortunado de tener el privilegio de trabajar con una persona que es ejemplo de trabajo y especialmente de vida.

- ⇒ Mi agradecimiento al Dr. Luis O. Carreras por brindarme la posibilidad de compartir su línea de investigación, por sus consejos y estimulantes discusiones en la preparación de la tesis.

- ⇒ Un especial agradecimiento para mi compañera de trabajo Marta Martinuzzo por su amistad y su constante apoyo en el trabajo compartido del laboratorio que permitió la preparación de esta tesis.

- ⇒ A todos los docentes del Laboratorio de Hemostasia de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su generosa ayuda.

- ⇒ A todo el personal profesional (bioquímicos y médicos), técnicos y secretarías del Departamento de Hematología de la Fundación Favaloro por su colaboración y paciencia para facilitarme el trabajo.

- ⇒ Parte de este trabajo de tesis ha sido posible en el marco del convenio de cooperación entre el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y el Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale de Francia.

A mis padres

El síndrome antifosfolípido (SAF) se caracteriza por la asociación de trombosis venosa o arterial, pérdidas fetales recurrentes y/o trombocitopenia con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL). La especificidad de estos anticuerpos por los fosfolípidos (FL) ha sido cuestionada en los últimos años y algunos datos experimentales indican la necesidad de ciertos cofactores proteicos para que ocurra la interacción entre los FL y los anticuerpos. La β_2 glicoproteína I (β_2 GPI) y la protrombina (II) humana son las principales proteínas reconocidas como cofactores.

Principales objetivos

- desarrollar ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos anti- β_2 GPI y anti-II en pacientes con aFL
- estudiar si las inmunoglobulinas G (IgG) purificadas de pacientes con SAF poseen distinta especificidad antigénica que aquellas obtenidas de pacientes con sífilis
- evaluar la especificidad antigénica de los aFL en relación a las complicaciones clínicas del SAF
- analizar la interferencia de los aFL sobre el sistema de la proteína C (PrC) y la biosíntesis de eicosanoides de origen plaquetario, como probables mecanismos fisiopatogénicos del SAF

Resultados

Se optimizaron las condiciones para la detección por ELISA de anticuerpos dirigidos contra β_2 GPI y II en ausencia de FL. La principal variable de los ensayos fue el tipo de superficie utilizada que junto con los datos de los experimentos de inhibición indicaron que los anticuerpos sólo reconocen a las proteínas cuando se presentan en una determinada conformación estructural. Los anti- β_2 GPI y anti-II se detectaron con una frecuencia mucho mayor en los pacientes con enfermedades autoinmunes asociadas a los aFL (SAF y lupus eritematoso sistémico) que en pacientes con aFL sin complicaciones clínicas del SAF. Los estudios con IgG purificadas demostraron que los aFL asociados con sífilis reconocen epitopes en los FL y la mayoría de las IgGs obtenidas de pacientes con SAF reaccionan específicamente con la β_2 GPI y/o II. En el estudio retrospectivo de 233 pacientes con aFL se encontró que los anti- β_2 GPI-IgG y los anti- β_2 GPI-IgM a títulos moderados o fuertes eran factores de riesgo independientes para trombosis venosa y complicaciones obstétricas, respectivamente. Además, los anti- β_2 GPI se asociaron con el fenómeno adquirido de resistencia a la PrC activada y con la alteración en la biosíntesis de tromboxano plaquetario, reflejada en una mayor excreción urinaria del metabolito 11-dehidro-tromboxano B₂.

En *conclusión*, la utilización de ensayos que nos permitan conocer la especificidad antigénica de los aFL podría ser de gran utilidad diagnóstica y permitir una mejor evaluación de los mecanismos patogénicos del SAF.

Palabras claves: anticuerpos antifosfolípidos, anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I, anticuerpos anti-protrombina, cofactores proteicos, síndrome antifosfolípido.

The antiphospholipid syndrome (APS) is characterized by the association of venous or arterial thrombosis, recurrent fetal loss and/or thrombocytopenia with the presence of antiphospholipid antibodies (aPL). In the last few years it has been questioned the specificity of these antibodies towards phospholipids (PL). Several studies have emphasized the involvement of some protein cofactors in the interaction between PL and aPL. β_2 glycoprotein I (β_2 GPI) and human prothrombin (II) are the best characterized protein cofactors.

Main objectives

- to standardize enzyme-linked immunoassays (ELISA) in order to evaluate the presence of anti- β_2 GPI and anti-II in patients with aPL
- to study if the purified immunoglobulins G (IgG) from APS patients differ in the antigenic specificity of those obtained from syphilis patients
- to evaluate the relationship between the antigenic specificity and the clinical complications of the APS
- to analyze the interference of the aPL on the protein C system and the platelet biosynthesis of eicosanoids

Results

We have standardized the ELISA for the detection of anti- β_2 GPI and anti-II antibodies in the absence of PL. The experimental evidences on the requirement of a special surface in solid-phase assays and the results of the inhibition studies indicated that these antibodies do not recognize proteins unless they have underwent a conformational change. Patients with aPL from the autoimmune group (APS and systemic lupus erythematosus) had a higher prevalence of anti- β_2 GPI and anti-II antibodies than those from the group without APS-related clinical complications or with infectious diseases. Using purified IgG fractions, we found that aPL from syphilis react with epitopes exposed on PL but those from APS patients bind mainly to β_2 GPI and II. In the retrospective analysis performed in 233 patients with aPL, we found that only anti- β_2 GPI of IgG and anti- β_2 GPI of IgM isotype are independent risk factors for venous thrombosis and obstetric complications, respectively. It was found specially when taking into account antibodies at moderate or high titres. Anti- β_2 GPI antibodies were closely related to the acquired phenomenon of activated protein C resistance and to the interference on the platelet biosynthesis of eicosanoids, mainly reflected by a significant increase in the urinary excretion of 11-dehydro-thromboxane B₂.

In *conclusion*, the introduction of new assays in order to clarify the true antigens of the aPL could be an important tool in the diagnosis and the evaluation of the pathogenic mechanisms of the APS.

Key words: antiphospholipid antibodies, anti- β_2 glycoprotein I antibodies, anti-prothrombin antibodies, protein cofactors, antiphospholipid syndrome.

INDICE

	<i>Páginas</i>
Abreviaturas	10
Introducción	
Rol de los fosfolípidos en el sistema de coagulación	12
Historia de los anticuerpos antifosfolípidos	14
Mecanismos de acción <i>in vitro</i> y características de los aFL	16
Rol de los cofactores proteicos	21
Pruebas de laboratorio para el estudio de los aFL	29
Asociaciones clínicas	37
Mecanismos patogénicos	42
Modelos animales del síndrome antifosfolípido	53
Objetivos de la tesis	56
Materiales y métodos	
Obtención de muestras de sangre	58
Recolección de muestras de orinas	58
Pacientes	58
Detección del anticoagulante lúpico	60
Detección de anticuerpos anticardioplipina	60
ELISAs modificados para la detección de aCL de isotipo IgG	61
Detección de anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I	62
Detección de anticuerpos anti-protrombina	63
Detección de autoanticuerpos por dot blotting	64
Estudios de inhibición	64
Dosaje de β_2 GPI	65
Purificación de la fracción IgG	66
Purificación de aCL por cromatografía de afinidad	67
Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio	68
Western blotting	68
Ensayos en fase sólida con IgGs purificadas	69
Adsorción de IgGs purificadas con liposomas de cardioplipina	70
Evaluación de la actividad anticoagulante de las IgGs purificadas	71
Dosaje de trombomodulina soluble plasmática	71
Dosaje de los niveles plasmáticos del activador tisular del plasminógeno	72

Determinación de la resistencia a la proteína C activada	72
Extracción de los metabolitos urinarios del TXA ₂	73
Purificación de los metabolitos urinarios del TXA ₂	74
Dosaje del 11-dehidro-tromboxano B ₂ urinario	75
Métodos estadísticos	75
Resultados y discusión	
Inmunoensayo para anti-β ₂ GPI y anti-II	78
Anti-β ₂ GPI y anti-II en pacientes con aFL	91
Especificidad antigénica de las IgG purificadas	104
Autoanticuerpos y complicaciones clínicas del SAF	114
Efecto sobre el sistema de la proteína C	123
Autoanticuerpos y metabolitos urinarios del TXA ₂	131
Conclusiones	140
Publicaciones del trabajo de tesis	145
Referencias bibliográficas	147

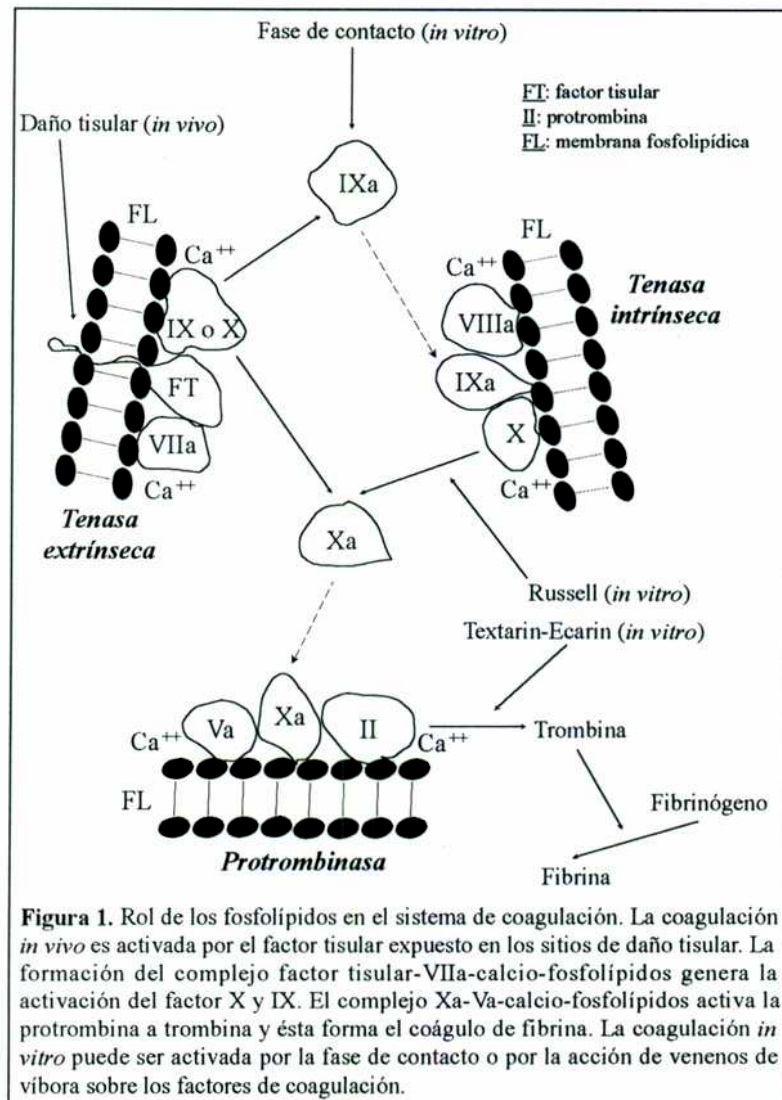
ABREVIATURAS

anti- β_2 GPI	anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I
anti-II	anticuerpos anti-protrombina
aCL	anticuerpos anticardiolipina
aFL	anticuerpos antifosfolípidos
AL	anticoagulante lúpico
LES	lupus eritematoso sistémico
SAF	síndrome antifosfolípido
TV	trombosis venosa
TA	trombosis arterial
CO	complicaciones obstétricas
IgG/M/A	inmunoglobulina G/M/A
CL	cardiolipina
FL	fosfolípidos
PI/S/E	fosfatidilinositol/serina/etanolamina
PrC	proteína C
PrS	proteína S
APC-R	resistencia a la proteína C activada
t-PA	activador tisular del plasminógeno
TM	trombomodulina
TXA ₂ /B ₂	tromboxano A ₂ /B ₂
PGI ₂	prostaciclina
11-DH-TXB ₂	11-dehidro-tromboxano B ₂
EIA/ELISA	enzimoinmunoensayo
APTT	tiempo de tromboplastina parcial activada
TTI	test de inhibición de la tromboplastina tisular
dRVVT	tiempo del veneno de víbora Russell
dPT	tiempo de protrombina con tromboplastina diluida
PNP	prueba de neutralización con plaquetas
PPP	plasma pobre en plaquetas
PBS	buffer fosfato salino
ABS	suero bovino adulto
BSA	albúmina bovina
DO	densidad óptica

INTRODUCCION

Rol de los fosfolípidos en el sistema de coagulación

La coagulación de la sangre es un proceso complejo que involucra la participación de numerosas proteínas plasmáticas conocidas como factores y cofactores de la coagulación. Este proceso enzimático en cadena resulta en una progresiva amplificación de la señal inicial.¹



En este sistema los fosfolípidos (FL) cumplen un rol crucial al proveer una superficie de anclaje que facilita la interacción entre los diferentes componentes de la cascada de coagulación. Los factores vitamina K dependientes (factores II, VII, IX y X) se unen a las superficies fosfolípicas a través de sus residuos ácido γ -carboxi-glutámico (dominios Gla) en presencia de iones de calcio. La unión del calcio a los residuos Gla induce un cambio conformacional que expone los sitios hidrofóbicos

necesarios para la unión de las proteínas.² Los factores V y VIII (cofactores) activados por trombina o factor Xa también se unen a las membranas fosfolipídicas, pero en forma independiente de los iones calcio. Ambos cofactores se unen a los FL a través de los dominios ubicados en la cadena liviana de la molécula proteica. En la Figura 1 se presenta un esquema del mecanismo en el que se observan los complejos enzimáticos unidos a superficies fosfolipídicas. La velocidad del proceso de coagulación es dependiente de la composición química de los FL y de las características de la superficie de la membrana fosfolipídica. Las membranas biológicas son funcional y estructuralmente asimétricas con amplias diferencias entre las capas interna y externa de la bicapa lipídica. En la mayoría de las células no estimuladas (por ejemplo plaquetas) predominan en la capa externa los FL tipo fosfatidilcolina y esfingomiélin y en la capa interna fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE). Sin embargo cuando se activan, se pierde la asimetría y se produce la exposición de PS en la capa externa de la membrana.³ Este aumento de la concentración de FL aniónicos en la capa externa es fundamental para la aceleración de las reacciones de activación del sistema de coagulación. La PS es el más potente y eficiente FL aniónico responsable de esta aceleración.

El sistema de coagulación puede ser activado *in vivo* por dos mecanismos. El extrínseco llamado también "vía extrínseca", es considerado el principal sistema de iniciación de la coagulación *in vivo* y comienza cuando el factor tisular entra en contacto con el sistema plasmático. El factor tisular es una glicoproteína integral de membrana que se expone como resultado del daño tisular o activación celular. El factor VII se une al dominio extracelular del factor tisular en presencia de calcio lo que lleva a la activación del factor VII sobre la membrana. Esta activación puede deberse a la acción de factor Xa, IXa, VIIa o trombina. Posteriormente el complejo factor tisular-VIIa-FL (complejo "tenasa") cataliza la transformación de factor X a Xa y la de factor IX a IXa.

El otro mecanismo de activación de la coagulación es la "vía intrínseca" iniciada por la exposición de los factores de la fase de contacto a las superficies cargadas negativamente como el colágeno o el tejido conectivo subendotelial. Este mecanismo es de poca significación como iniciador *in vivo* y su activación parece resultar de la acción de la trombina sobre el factor XI. La "vía intrínseca" es importante en el mantenimiento de la formación de la fibrina, una vez que el proceso de la coagulación se ha iniciado. El factor XIa activa al factor IX y el IXa junto con el VIII activado por trombina se unen a las superficies fosfolipídicas en presencia de calcio. Este complejo "tenasa" convierte al factor X en Xa. El factor Xa convierte la

protrombina (II) unida a la membrana en trombina a través del complejo "protrombina" formado por calcio, FL, y los factores Xa y Va. Finalmente la trombina se libera de las superficies fosfolípicas y convierte al fibrinógeno en fibrina por clivaje de las cadenas A α y B β . La fibrina es luego estabilizada por la acción del factor XIII activado por trombina. La trombina es una enzima clave en la hemostasia no sólo por sus propiedades procoagulantes, sino también por las anticoagulantes.⁴

La activación del sistema de coagulación puede iniciarse *in vitro* a partir de la fase de contacto, como resultado de la activación de los factores XII, precalicreína, kininógenos de alto peso molecular y XI por contacto con superficies cargadas negativamente como el vidrio, el caolín o el ácido eláxico. También hay venenos de víbora que pueden lograr la coagulación, como el Russell que activa el factor X o el Textarin y Ecarin que activan directamente la protrombina.

Historia de los anticuerpos antifosfolípidos

Los aFL fueron detectados por primera vez en 1906 cuando Wasserman y col. reportaron un ensayo de fijación de complemento para identificar las reagentas.⁵ Las reagentas fueron detectadas en el suero de pacientes con sífilis por su reactividad con los extractos salinos de hígado de fetos con sífilis congénita. En los años posteriores se desarrollaron otros tests de fijación de complemento y de floculación utilizando extractos alcohólicos de diversos tejidos normales como antígenos.⁶ En 1941, Pangborn⁷ demostró que el antígeno reconocido por las reagentas era un fosfolípido aniónico extraído del corazón bovino. Este FL fue denominado cardioplipina (CL). En el año 1946 se propuso un test de microfloculación para sífilis que se llamó Veneral Disease Research Laboratory (VRDL).⁸ El antígeno de este ensayo está constituido por liposomas de CL, fosfatidilcolina y colesterol. Desde que esta prueba fue utilizada rutinariamente, se encontraron algunos individuos que tenían un resultado positivo sin presentar sífilis.⁹ Los resultados falsos positivos biológicos para sífilis pueden aparecer en forma transitoria en pacientes con infecciones agudas, o pueden permanecer en forma crónica en pacientes con enfermedades autoinmunes.⁹ Simultáneamente, en la década del 50, Conley y Hartmann¹⁰ publicaron sus hallazgos sobre la presencia de un inhibidor de la coagulación en dos pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Este inhibidor prolongaba los ensayos de coagulación y se encontraba asociado a la presencia de reagentas detectadas por la VDRL. En otro artículo se describió un inhibidor similar, asociado a un resultado falso positivo para sífilis, en un paciente sin LES.¹¹ La actividad anticoagulante de este inhibidor pudo ser

adsorbida cuando se trataron los plasmas con el antígeno de Khan (utilizado en los ensayos para sífilis) que contiene cardiolipina.¹²

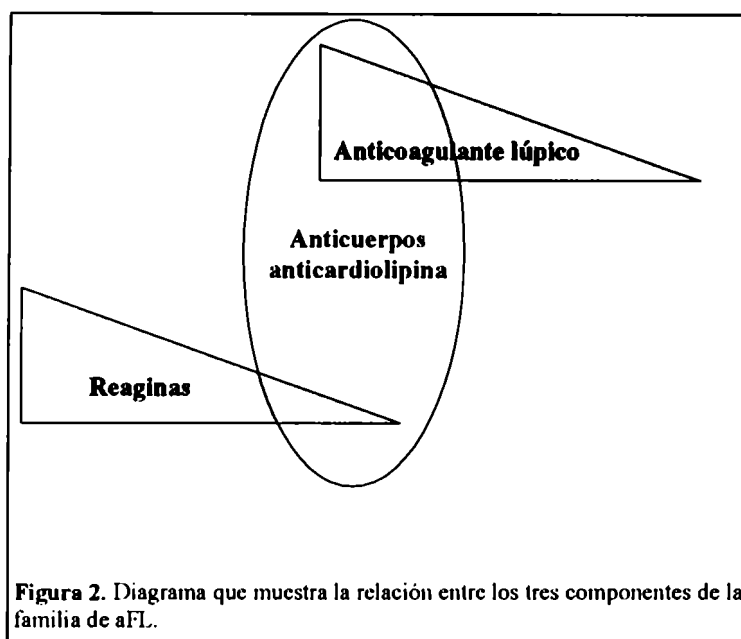
En los años posteriores varios artículos se publicaron sobre la aparición de este inhibidor circulante de características especiales en pacientes con LES y esto condujo a Feinstein y Rapaport¹³ a introducir el término de "anticoagulante lúpico" (AL). Sin embargo, el AL no es específico de los pacientes con LES y puede presentarse en pacientes sin enfermedades autoinmunes. Hay varios reportes de presencia de AL en pacientes con neoplasias, infecciones, asociados al tratamiento con ciertas drogas y en personas sanas.¹⁴⁻¹⁹ A pesar de estas otras asociaciones, el nombre de AL aún persiste para denominar a este inhibidor circulante.

Aunque el AL fue reportado originalmente en pacientes con desórdenes hemorrágicos,¹⁰ estas complicaciones clínicas son muy raras en estos pacientes.^{18,20,21} Cuando las hemorragias se presentan se asocian a estados de trombocitopenia o hipoprotrombinemia severa.^{20,22,23} Por el contrario, una fuerte asociación con eventos tromboembólicos fue reportada desde el estudio de Laurell y Nilsson.¹² En 1963, Bowie y col.²⁴ encontraron que 4 de 8 pacientes con AL tenían historia de trombosis. En una revisión de la década del 70, el 27% de los pacientes con AL tenían trombosis.²⁵ Otra de las complicaciones clínicas frecuentemente asociadas a la presencia del AL son los abortos recurrentes. En el primer estudio en el que se encontró esta asociación, se describió el caso de una mujer con 5 pérdidas fetales, presencia de AL y resultados falsos positivos para sífilis.¹²

A principios de la década del 80, algunos investigadores trataron de desarrollar un test en fase sólida que fuera sensible para la detección de los anticuerpos responsables de la actividad de AL. El objetivo era encontrar un ensayo que reemplazara a la VDRL pues se pensaba que ésta era poco sensible y específica para detectar esos anticuerpos. En ese momento se sabía que la cardiolipina estaba presente en el reactivo usado para los ensayos de sífilis y se intentó desarrollar un inmunoensayo utilizando cardiolipina como antígeno. En 1983 se propuso un radioinmunoensayo²⁶ que fue rápidamente reemplazado por un enzimoimmunoensayo (ELISA).²⁷ La utilización de este nuevo ensayo permitió un screening muy amplio y se demostró que la mayoría de los pacientes con AL presentaban un resultado positivo en el ensayo de anticuerpos anticardiolipina (aCL).^{28,29}

Inicialmente se pensaba que las actividades de AL y aCL se debían al mismo anticuerpo, pero en estudios posteriores se observó que algunos pacientes sólo presentaban resultados positivos en uno de los dos ensayos.³⁰ Estas discrepancias fueron confirmadas en otros estudios clínicos^{31,32} y además se demostró que los anticuerpos con actividad de AL podían ser separados como entidades diferentes de

aquellos con actividad de aCL.^{33,34} De esta manera se consideró a los anticuerpos antifosfolípidos (aFL) como una familia compuesta por tres tipos de anticuerpos relacionados: AL, aCL y reaginas. La Figura 2 es un diagrama que muestra la presencia de estos tres componentes de la familia de aFL y el grado de superposición entre ellos.



Mecanismos de acción in vitro y características de los aFL

En los primeros reportes sobre las características del inhibidor circulante se observó que prolongaba el tiempo de coagulación de la sangre entera y el tiempo de protrombina.^{10,35} La actividad inhibitoria no se neutralizaba si se añadía plasma normal al del paciente y dependía de la concentración de tromboplastina utilizada en el ensayo.³⁵ La primera sospecha de que el AL era una inmunoglobulina se obtuvo en 1955 al observarse que el anticoagulante circulante presente en una mujer, se encontraba en la sangre de su hijo durante los seis primeros meses de vida.¹¹ Esto fue confirmado más tarde por otros estudios.^{36,37} Los primeros datos que indican que el AL interfiere a nivel del complejo protrombinasa provienen del año 1965.³⁷ Esto explicaba la observación de que el AL se caracterizaba por la prolongación de las pruebas que evalúan las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación sin afectar el tiempo de trombina que evalúa el pasaje de fibrinógeno a fibrina. En 1980, Thiagarajan y col.³⁸ demostraron por primera vez que una inmunoglobulina M (IgM) monoclonal con actividad de AL era capaz de bloquear la unión de la protrombina y el

factor X a las micelas fosfolípídicas, la que depende de calcio. Estos estudios se realizaron con la IgM y con el fragmento Fab_μ purificados de un paciente con macroglobulinemia. Los mismos mostraron que el anticuerpo reaccionaba específicamente con fosfolípidos aniónicos (PS y PI) y no con FL neutros (PE y fosfatidilcolina) cuando usaban ensayos de inmunodifusión. Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizaron las fracciones de inmunoglobulina G (IgG) purificadas por adsorción con liposomas de cardiolipina y cromatografía de afinidad en columna de proteína A.^{39,40} Estos experimentos permitieron postular que el mecanismo de acción de los aFL *in vitro* era el de inhibición de la unión de los factores vitamina K dependientes a las superficies fosfolípídicas.

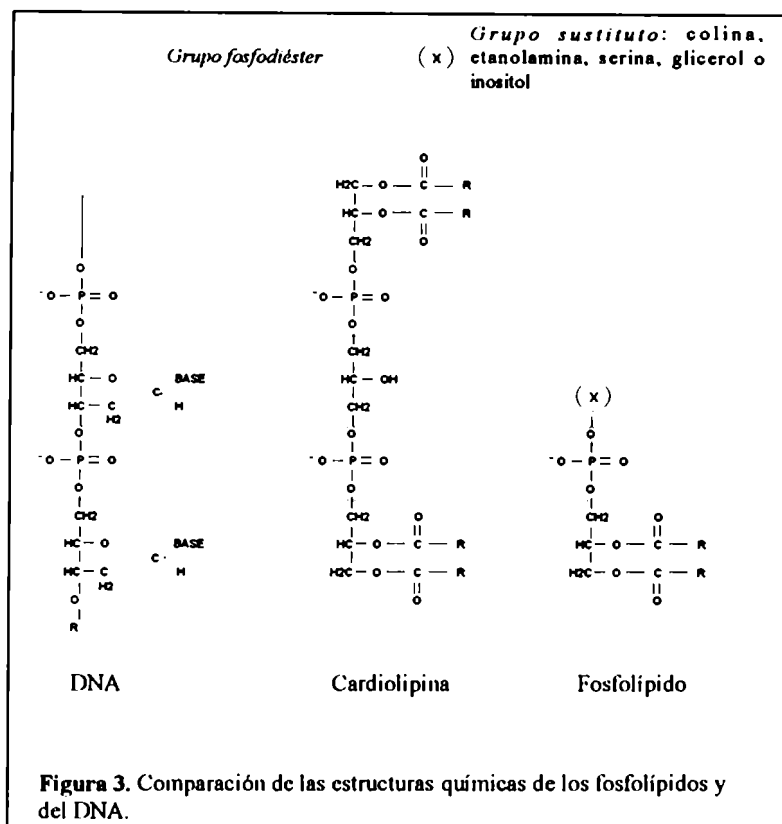
Reacción cruzada de los aFL. Posibles epitopes antigénicos

Desde la introducción de los ensayos en fase sólida para la detección de aCL, ha quedado claro que hay cierto grado de discordancia entre los resultados de aCL y la presencia del AL.³⁰⁻³² Más aún, se ha demostrado que en un mismo suero se puede lograr la separación de fracciones de inmunoglobulinas con actividad de AL y otras con actividad de unión a la cardiolipina en fase sólida.^{33,34} Algunos investigadores, utilizando cromatografía de afinidad a CL y PS y elución con gradientes de sales, mostraron que los aFL son heterogéneos y existen en un mismo paciente subpoblaciones de anticuerpos que varían en su avidez por CL y PS.⁴¹

Una posibilidad para explicar las diferencias de los resultados entre AL y aCL era que los anticuerpos responsables de la actividad de AL estuvieran dirigidos contra otros FL diferentes de la CL. Sin embargo varios estudios demostraron que en los sueros con ambas actividades la reactividad a la CL era similar a la de otros FL aniónicos.^{15,40,42,43} En algunos reportes se encontró que la reactividad con PS era más frecuente que la de CL en pacientes con AL.^{30,44} Otra posibilidad es que los anticuerpos expresen actividad de AL cuando los FL se encuentran en una configuración diferente de aquella que se les presenta en una placa de ELISA.

La reacción cruzada de los aCL con otros FL aniónicos se basa en los resultados obtenidos con dos tipos de experimentos: 1) la unión a CL en el ELISA es inhibida cuando los sueros positivos para aCL son preincubados con liposomas preparados con distintos FL aniónicos^{39,40,43} y 2) hay una excelente correlación entre la unión de los anticuerpos a la CL y la observada cuando se utilizan diferentes FL aniónicos pegados a placas de ELISA.⁴⁵⁻⁴⁸ Esta reactividad cruzada fue explicada en base a ciertas características químicas compartidas por los FL (Figura 3). Esta familia

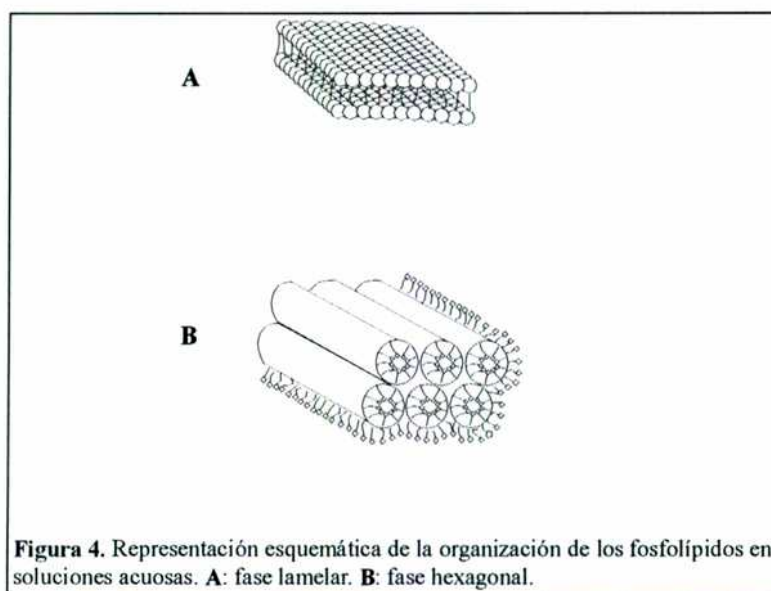
de moléculas tiene en común el grupo fosfodiéster con carga negativa y esto sugirió que ese sitio era el epítopo reconocido por los aFL. Sin embargo los aFL no se unen a la fosfatidilcolina o muy infrecuentemente a la PE que también tienen un grupo fosfodiéster.⁴² La explicación propuesta es que los grupos colina o etanolamina positivos interactúan con la carga negativa del grupo fosfodiéster y de esta manera bloquean el acceso del anticuerpo al epítopo. Esto no sucedería cuando los grupos sustitutos no tienen carga (inositol, serina, etc.).



Varios reportes han mostrado que los anticuerpos mono o policlonales anti-DNA pueden tener reacción cruzada con la CL y que los aCL monoclonales reaccionan con el DNA de doble cadena.^{49,50} Esto puede ser explicado por la similitud entre los grupos fosfodiéster repetidos de la molécula del DNA y la región polar de la CL (Figura 3). Sin embargo estudios posteriores no encontraron resultados similares.^{40,43,51} Harris y col.^{40,43} no pudieron demostrar un efecto inhibitorio de la actividad de los aCL por el DNA o de los anticuerpos anti-DNA por la CL. En estos estudios también se mostró que los aCL purificados por afinidad no se unen al DNA y que los anticuerpos anti-DNA no reaccionan con la CL. La conclusión actual es que los aFL y los anti-DNA son grupos diferentes de anticuerpos. Es probable que la porción glicérido de la molécula del FL sea además un determinante importante en la

interacción FL-aFL. Recientemente ha sido demostrado que los aCL no se unen a los FL que poseen cadenas de ácidos grasos de menos de 16 átomos de carbono.⁵²

Algunos estudios han sugerido que la conformación de los FL es importante en la reactividad con los aFL. Rauch y col.⁵³ encontraron que los anticuerpos con actividad de AL derivados de hibridomas humanos sólo reconocen a la PE cuando se encuentra en fase hexagonal y no cuando está en fase lamelar. Estos resultados fueron logrados utilizando PE sintética que es capaz de adoptar una estructura en bicapa (a 37°C) o hexagonal (a 43°C) cuando es hidratada (Figura 4). Resultados similares fueron obtenidos cuando se inhibió (81 a 99%) el AL presente en pacientes con LES con la PE hexagonal. Los autores sugieren que el AL *in vivo* podría ser inducido o reaccionar con estructuras de tipo hexagonal que resultarían de alteraciones de las membranas celulares. Más aún, los mismos autores mostraron que la PE es inmunogénica en ratones cuando está en fase hexagonal⁵⁴ produciéndose anticuerpos que tienen actividad de AL y reaccionan en fase sólida con PE y CL.



Distintos grupos de investigadores han tratado de evaluar la relación entre los aFL presentes en pacientes con síndrome antifosfolípido (SAF) y aquellos detectados en pacientes con sífilis. Este interés proviene del hecho de observar las diferencias clínicas entre ambos grupos de pacientes. En sífilis es frecuente encontrar aCL positivos que en algunos reportes demostraron tener reacción cruzada con la PE,¹⁵ mientras que en otros estudios lo hicieron preferentemente con la PS.^{45,55} Sin embargo, Harris y col.⁴² encontraron que las reaginas tienen una reactividad preferencial con la CL comparada con los otros FL aniónicos. En su opinión los aCL de pacientes con sífilis pueden ser distinguidos de los de pacientes con SAF a través

de la diferente reactividad con los FL aniónicos (especialmente PS). Con el objetivo de clarificar la especificidad de los sueros con sífilis se desarrolló un ELISA usando el reactivo de la VDRL. Los resultados mostraron que las reaginas tenían mayor actividad de unión a la CL de la VDRL que a la CL sola,⁴² indicando que la unión es mejor cuando la CL adquiere una conformación diferente al estar mezclada con la fosfatidilcolina y colesterol.^{7,42} Lo contrario sucede con los aFL de los pacientes con SAF. El AL es raramente encontrado en pacientes con sífilis y se han demostrado diferencias en el efecto funcional de los aCL provenientes de pacientes con sífilis o con enfermedades autoinmunes sobre la reacción de la protrombinasa *in vitro*.⁵⁶ Usando anticuerpos de similar reactividad con la CL por ELISA, se observó que solamente las preparaciones de los pacientes con SAF eran capaces de inhibir esa reacción. Esto no se puede explicar por las diferencias en la especificidad fosfolipídica, porque se demostró que los anticuerpos autoinmunes pueden inhibir la reacción cuando se usa PS o CL como catalizador y en cambio los anticuerpos de sífilis son incapaces de interferir aún cuando se use CL en la reacción. Parece probable que la unión de los aFL no depende sólo de la estructura química, sino también de las características fisicoquímicas (como la conformación) del antígeno.

Diferencias en las subclases de IgG

Las IgGs son una familia de cuatro subclases de inmunoglobulinas con diferentes propiedades estructurales y biológicas. Algunas de sus actividades biológicas están relacionadas a la habilidad de activar el sistema del complemento y de unirse a los receptores Fc sobre las superficies celulares. En sueros humanos las proporciones normales de las diferentes subclases son: IgG₁ 60-71%, IgG₂ 19-31%, IgG₃ 5-8% e IgG₄ 0,7-4%. En general se observan desbalances en las subclases de IgG en los pacientes con distintas enfermedades autoinmunes. Se han relacionado con la naturaleza del antígeno inductor de la respuesta inmune y con la naturaleza y producción de citoquinas por parte de las células T. El estudio de Gharavi y col.⁵⁷ mostró que todas las subclases de IgG pueden ser encontradas en los aCL de pacientes con LES, a diferencia de la preponderancia de IgG₁ e IgG₃ en los anticuerpos anti-DNA. Sin embargo, encontraron que las complicaciones clínicas eran más frecuentes en los pacientes con LES y mayor prevalencia de aCL de las subclases IgG₂ e IgG₄. Además, contrariamente a la distribución normal de 2/3 de κ y 1/3 de λ , existe una preponderancia de cadenas livianas λ en los aCL presentes en estos pacientes. Resultados similares fueron reportados por Levy y col.⁵⁵ en pacientes con

LES y aCL. En este mismo estudio se evaluaron las subclases de IgG en pacientes con sífilis y se observó una mayor prevalencia de IgG₁, IgG₃ y cadenas κ en los aCL inducidos por esta infección. Los datos parecen involucrar a la subclase IgG₂ como responsable de la actividad aCL en el ELISA y asociada con un mayor riesgo de eventos clínicos en pacientes con SAF. La diferencia en la distribución de las subclases entre SAF y sífilis implica que hay diferencias en el antígeno inductor o en la presentación del mismo.

Rol de los cofactores proteicos

A pesar del concepto generalizado de que los aFL tenían especificidad por los FL, hubo una serie de datos que no eran compatibles con este pensamiento y sugerían un rol importante de ciertas proteínas plasmáticas. Clyne⁵⁸ encontró que ciertos AL sólo prolongaban las pruebas de coagulación en plasma humano y no en plasma de origen bovino. Algunos AL sólo inhibían la activación de la protrombina sin afectar la activación del factor X.³⁷ Además en 1959 se demostró que en ciertos AL se observaba un efecto cofactor cuando el plasma del paciente se mezclaba con el del normal. Se interpretó que la causa de ese efecto (mayor prolongación de la mezcla respecto al plasma del paciente) era la presencia de la protrombina aportada por el plasma normal.³⁶ En 1965 se demostró que la actividad de AL requería de una proteína que no era la protrombina ni tampoco una inmunoglobulina.³⁷

Protrombina humana

La presencia de hipoprotrombinemia adquirida en algunos pacientes con AL sugirió tempranamente que la protrombina podría tener cierta función relevante en el antígeno reconocido por el AL. En 1983 se presentaron los primeros datos de la existencia de anticuerpos con alta afinidad por la protrombina responsables de la formación de complejos que eran rápidamente eliminados de la circulación.⁵⁹ Estos anticuerpos fueron estudiados por inmunodifusión y se caracterizaron como no neutralizantes porque no reaccionaban con el sitio funcional de la proteína. Posteriormente se encontró, por estudios de inmunoelectroforesis cruzada, que los complejos anticuerpos-protrombina estaban también presentes en los pacientes con niveles normales de protrombina.⁶⁰ La conclusión de estos estudios fue que existían anticuerpos de baja afinidad que no producían hipoprotrombinemia pero eran

responsables de la actividad de AL. La hipótesis proponía que los anticuerpos eran polireactivos y reaccionaban con epitopes localizados en los FL y en la protrombina.

En un trabajo reciente se sometieron 16 plasmas de pacientes con AL y aCL al método de adsorción con liposomas de CL y se encontró que en 11 casos la actividad de AL permanecía en el sobrenadante.⁶¹ Los AL aislados interferían con los tests de coagulación solamente en presencia de plasma humano. Cuando trabajaron con un sistema compuesto por factores de coagulación purificados (Xa, Va y protrombina) y vesículas de PS y fosfatidilcolina, encontraron que los anticuerpos solo inhibían la activación de protrombina humana y no la de origen bovino. El efecto era independiente del origen (humano o bovino) de los factores Xa y Va, y sólo se observaba en presencia de vesículas de FL. Resultados similares se obtuvieron al utilizar plaquetas activadas o microvesículas derivadas de plaquetas en lugar de las vesículas de FL. El tipo de FL presente en las membranas es importante ya que se demostró que la PS induce un profundo cambio conformacional en la molécula de protrombina.⁶² En un estudio reciente se encontró que el 18% de las IgG purificadas con actividad de AL eran capaces de inhibir la actividad de protrombinasa sobre las células endoteliales, pero esta inhibición sólo pudo ser adsorbida con vesículas de CL en presencia de protrombina y calcio.⁶³ Otros autores, trabajando con 10 IgG purificadas, postularon que el AL se uniría a un epitope sobre la protrombina y luego a los FL a través de la interacción FL-protrombina mediada por calcio.⁶⁴ De todos estos estudios se concluye que los AL ejercen su actividad anticoagulante al interaccionar con el complejo, mediado por calcio, de la protrombina humana unida a FL.

En un trabajo realizado con 15 IgG purificadas de pacientes con AL se confirmó que todas las preparaciones eran capaces de inhibir la activación de protrombina humana en un sistema purificado, pero además se observó que el 30% de las IgG inhibían también la activación de la protrombina bovina.⁶⁵

β_2 glicoproteína I

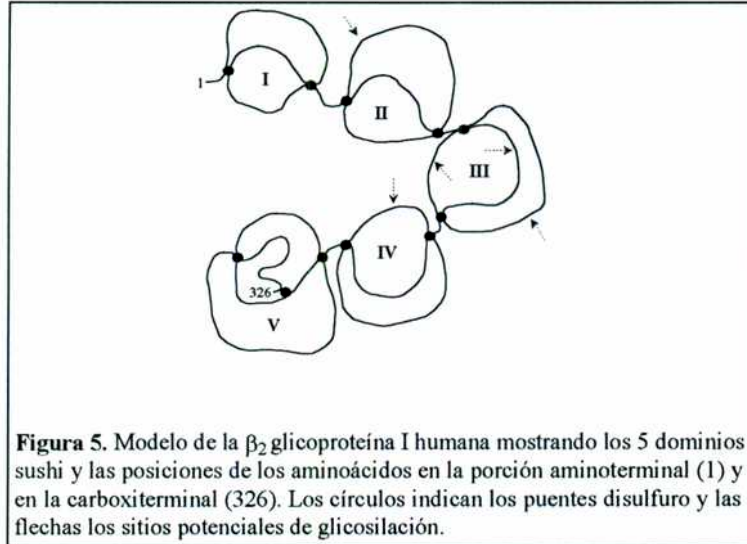
La importancia de esta proteína plasmática en el estudio de los aFL proviene de los resultados publicados en el año 1990 por tres grupos independientes de investigadores.⁶⁶⁻⁶⁸ Ellos demostraron que los aCL purificados por afinidad no podían unirse en ensayos de ELISA a la CL en ausencia de suero o plasma. Se infirió la necesidad de un cofactor proteico presente en los mismos. Este cofactor fue luego identificado como β_2 glicoproteína I (β_2 GPI). Esto permitió explicar por qué los aCL

purificados por cromatografía de intercambio iónico o de afinidad a FL no eran capaces de unirse a la misma columna de afinidad en ausencia de plasma.³⁴ La razón es que durante la cromatografía el cofactor es eliminado. Sin embargo los mismos aCL purificados son capaces de unirse a la CL en el ELISA que usa suero bovino en las soluciones bloqueante y diluyente como fuente de cofactor. El requerimiento de un cofactor proteico también permite explicar la necesidad de usar soluciones basadas en suero bovino para validar los ensayos de ELISA para aCL.^{27,47}

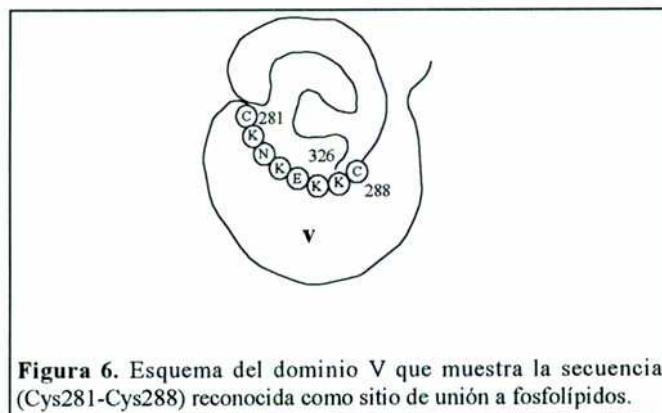
La β_2 GPI fue descrita por primera vez en 1961 y por sedimentar junto con las fracciones de lipoproteínas por el método de ultracentrifugación ha sido denominada apolipoproteína H.⁶⁹ Aproximadamente el 40% de la proteína en plasma está asociada con las fracciones lipoproteicas y el 60% circula en forma libre. Su concentración plasmática es de aproximadamente 200-250 $\mu\text{g/ml}$ y la síntesis se lleva a cabo principalmente en los hepatocitos. La secuencia aminoacídica completa ha sido determinada por secuenciación peptídica en 1984, y los resultados indican que es una molécula de cadena simple compuesta por 326 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 50 kD.⁷⁰ En los años siguientes se logró clonar el DNA complementario. La β_2 GPI es uno de los miembros de la superfamilia de las proteínas que controlan el sistema del complemento, a la que también pertenecen la proteína de unión a C4b (C4bBP), el factor H, los receptores de complemento tipo 1 y 2, etc.⁷¹ Otras proteínas con cierta similitud estructural son el receptor de la interleukina 2, el factor XIII de coagulación y la familia de las selectinas. Todas estas proteínas tienen en común la presencia de dominios sushi. La β_2 GPI está compuesta de cinco dominios de aproximadamente 60 aminoácidos cada uno (Figura 5). Los cuatro primeros presentan un patrón conservado de cisteínas, prolina y triptofanos y se parecen a los típicos dominios sushi. Por el contrario el dominio V es aberrante por contener 82 aminoácidos, dos cisteínas adicionales y una larga fracción carboxiterminal. Los residuos cisteínas son los que forman los 11 puentes disulfuro internos. El 18% del peso molecular de la proteína se debe a la presencia de 5 residuos de oligosacáridos unidos a asparagina.

Esta proteína está altamente conservada en las diferentes especies lo que sugiere que tendría un rol importante en algún proceso fisiológico. Aunque se desconoce su rol, los estudios *in vitro* indican que actuaría como un anticoagulante natural. Ha sido demostrada su capacidad de inhibir la activación de la vía intrínseca de la coagulación usando superficies no fisiológicas,⁷² la activación del factor XII sobre lipoproteínas ricas en triglicéridos,⁷³ la agregación plaquetaria inducida por ADP,^{74,75} la actividad protrombinasa de las plaquetas activadas⁷⁶ y la generación de factor Xa por las plaquetas.⁷⁷ Recientemente se presentaron evidencias de que la

β_2 GPI tendría además una función procoagulante al inhibir la acción de la proteína C activada (APC).⁷⁸ La importancia fisiológica de la β_2 GPI como anticoagulante se evidencia en un estudio reciente⁷⁹ que mostró una considerable reducción de esta proteína en los pacientes con coagulación intravascular diseminada o con enfermedades trombóticas.



La β_2 GPI tiene la propiedad de unirse a estructuras moleculares cargadas negativamente, como DNA, heparina, plaquetas activadas, membranas celulares apoptóticas y vesículas fosfolipídicas aniónicas.^{80,81} La zona de la proteína involucrada en la unión a los FL ha sido localizada en el dominio V⁸² y corresponde a una secuencia rica en residuos lisina (cys₂₈₁-lys-asn-lys-glu-lys-lys-cys₂₈₈) (Figura 6).



Estudiando el modelo de la estructura tridimensional se evidenció que esta secuencia está expuesta en la superficie de la molécula. La región responsable de la unión a los FL fue hallada utilizando diferentes péptidos sintéticos del dominio V y

evaluando el grado de inhibición de la unión de aCL purificados a la CL en ELISA.⁸² Estos datos fueron luego confirmados por otro grupo⁸³ que usó el sistema de baculovirus para expresar genes mutantes en los cuales se delecionaron zonas que codifican para los distintos dominios sushi de la β_2 GPI. Estos autores demostraron que la región de unión a FL se encuentra solamente en el dominio V.

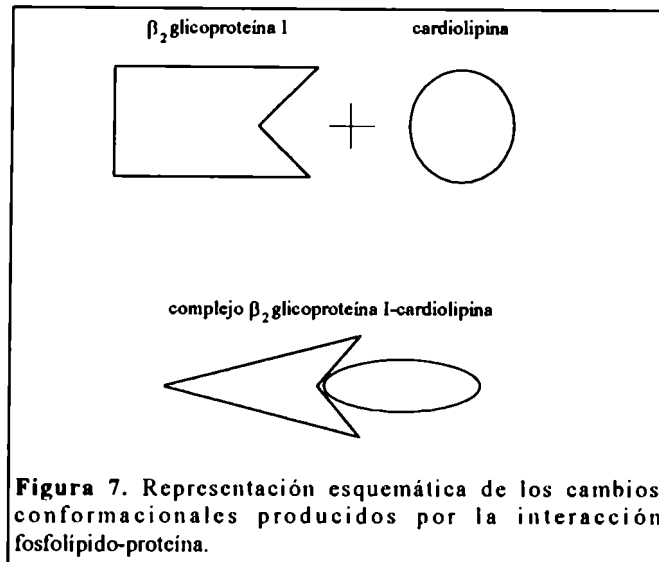
Las características de la unión de la β_2 GPI humana a la CL han sido recientemente estudiadas.⁸⁴ Se evaluaron las condiciones químicas y la base molecular de la interacción a través de ELISA (Tabla 1). Las conclusiones de este estudio son que la estructura tridimensional nativa no es necesaria para la unión y que los residuos lisina (como los presentes en la secuencia del dominio V) de la molécula son cruciales en la interacción.

Tabla 1. Resultados de los ensayos para evaluar las características de la interacción β_2 GPI-CL.

<i>Variable</i>	<i>Resultado</i>
pH	Optima a pH 7-8
Fuerza iónica	La unión disminuye al aumentar la concentración de NaCl
Cationes bivalentes	A concentraciones fisiológicas no afectan la unión
Inactivación por calor	No altera la interacción
Reducción de puentes S-S	No modifica la unión
Modificación de grupos NH ₂	Inhibe la unión a CL

Por el contrario, en dos estudios^{85,86} se demostró que la conformación de la β_2 GPI es fundamental para una óptima unión a FL. Para ello utilizaron formas de la proteína clivadas en las posiciones lys₃₁₇-thr₃₁₈ o en ala₃₁₄-phe₃₁₅ del dominio V y observaron que estas preparaciones no tenían habilidad para unirse a FL. Concluyeron que aunque el clivaje no esté en la secuencia de unión a FL, las conformaciones de las regiones cercanas a la misma son importantes para permitir la unión. Al evaluar la importancia de los carbohidratos se observó que éstos no eran claves en la interacción porque las constantes de disociación de la β_2 GPI nativa y de la β_2 GPI tratada con neuraminidasa a la CL eran similares (Kd: 10⁻⁸M).⁸⁶ El tipo de FL es importante ya que la β_2 GPI solamente interacciona con liposomas de FL aniónicos (CL, PS y PI) y no con liposomas de fosfatidilcolina.^{80,86} Como resultado de esta unión la β_2 GPI sufre cambios conformacionales.⁸⁷ Por otra parte, usando la técnica de espectroscopía

infrarroja,⁸⁸ ha sido reportado que cuando la β_2 GPI se mezcla con cardiolipina se producen profundos cambios en las estructuras de ambas moléculas (Figura 7).



Luego de los primeros reportes sobre el rol de la β_2 GPI en el ensayo de aCL, varias publicaciones han mostrado que existen 2 tipos diferentes de aCL.⁸⁹⁻⁹³ Los anticuerpos presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes requieren β_2 GPI (dependientes de β_2 GPI) como cofactor para la unión de los aCL a la CL pegada a placas de ELISA. En cambio, los aCL relacionados a infecciones (sífilis, lepra, etc.) se unen a la CL sola en ELISA (independientes de β_2 GPI) y además su unión se inhibe por la presencia de β_2 GPI debido a un mecanismo de competición. Este efecto inhibitorio es particularmente evidente con la β_2 GPI de origen humano y en menor medida con la proteína bovina. El requerimiento del cofactor es controvertido; algunos autores consideran que la β_2 GPI aumenta la unión de los aCL a la CL, pero que su presencia no es imprescindible para que ocurra tal interacción.^{94,95} La hipótesis de estos investigadores es que los aCL están dirigidos contra epitopes presentes en la CL que se exponen cuando se produce la unión FL-proteína.

Un subgrupo de los anticuerpos con actividad de AL ejerce su propiedad anticoagulante en una forma dependiente de β_2 GPI. Oosting y col.⁹⁶ demostraron que la actividad plasmática de AL se eliminaba cuando se deplecionaba el plasma de β_2 GPI por medio de cromatografía de afinidad. Además observaron que la actividad era restituida al añadir β_2 GPI humana purificada al plasma. En 1992 Galli y col.⁹⁷ presentaron los resultados de su estudio en 16 pacientes con AL y aCL de isotipo IgG. En el mismo los plasmas fueron adsorbidos con liposomas de cardiolipina-fosfatidilcolina-colesterol lo que permitió observar que en 5 plasmas ambas

actividades (AL y aCL) sedimentaban con los liposomas y en los restantes 11 plasmas el AL permanecía en el sobrenadante y los aCL eran removidos por los liposomas. A los aCL de los primeros 5 plasmas los llamaron aCL-tipo A y a los de los otros 11 plasmas aCL-tipo B. En la Tabla 2 se muestran las características diferenciales de los tres tipos de anticuerpos definidos por estos autores.

Tabla 2. Propiedades de los anticuerpos definidos por Galli y col.⁹⁷

	<i>Actividad anticoagulante</i>	<i>Cofactor</i>	<i>Especificidad de especie</i>
aCL-tipo A	Si	β_2 GPI	No
aCL-tipo B	No	β_2 GPI	No
AL	Si	Protrombina humana	Si

Los aCL-tipo A tenían actividad anticoagulante pero ésta era estrictamente dependiente de la presencia de β_2 GPI. Sin embargo podían ejercer la actividad en plasma humano y también en aquellos de diferentes orígenes animales (bovino, de rata, de cabra). Esto los diferencia claramente de los anticuerpos denominados AL que requieren protrombina como cofactor y exclusivamente de origen humano.⁶¹ Los aCL-tipo B no poseían actividad anticoagulante y sólo se unían a CL en ELISA en presencia de β_2 GPI humana o bovina. Evaluaron además el efecto de los aCL-tipo A sobre la actividad protrombinasa en un sistema compuesto por vesículas de PS y fosfatidilcolina (proporción 20:80) y factores Xa, Va y protrombina purificados. Encontraron que los aCL-tipo A inhibían la actividad protrombinasa potenciando el efecto anticoagulante de la β_2 GPI. Sin embargo, los mismos anticuerpos no alteraban la generación de trombina cuando se evaluaban en un sistema desprovisto de vesículas de FL o de β_2 GPI.

La dependencia de β_2 GPI de los anticuerpos con actividad de AL ha sido confirmada por otro estudio que utilizó IgG purificada de pacientes con enfermedades autoinmunes.⁹⁸ Otros grupos de investigadores han evaluado las actividades de anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra la β_2 GPI humana provenientes de ratones y conejos, respectivamente.⁹⁹⁻¹⁰¹ Utilizando sistemas purificados del complejo protrombinasa¹⁰⁰ o ensayos de coagulación dependientes de FL,⁹⁹⁻¹⁰¹ los autores concluyeron que estos anticuerpos tenían efecto anticoagulante y se comportaban de manera similar a los aCL-tipo A.

Kininógenos de alto y bajo peso molecular

El requerimiento de cofactores proteicos para la detección de anticuerpos antifosfolípidos aniónicos condujo a algunos investigadores a evaluar si las mismas proteínas eran necesarias para la reactividad de los aFL dirigidos contra FL de carga neutra. Se demostró que la β_2 GPI y la protrombina no eran capaces de actuar como cofactores de los anticuerpos antifosfatidiletanolamina (aPE). En cambio esa función era ejercida por ciertas proteínas que intervienen en la fase de contacto de la coagulación.¹⁰² Entre ellas se encuentran los kininógenos de alto y bajo peso molecular, el factor XI y la precalicreína que normalmente circulan en plasma complejados con los kininógenos. En el artículo original,¹⁰² demostraron que 11 de los 13 sueros de pacientes con LES y aPE de isotipo IgG reconocían un complejo de PE con kininógenos de origen bovino. Además sugirieron que en los otros dos pacientes los anticuerpos podrían reaccionar con complejos de PE y factor XI o precalicreína unidos a los kininógenos. Estos resultados preliminares fueron luego confirmados en otro estudio en el que además encontraron que la mayoría de los aPE de isotipo IgM eran independientes de kininógenos.¹⁰³ Esta discrepancia en el requerimiento de cofactores para los aPE de diferentes isotipos no ha sido aclarada aún. Recientemente se estudió la influencia de diferentes FL en la reactividad de los aPE en presencia de kininógenos y los resultados demostraron que la CL, PS y la fosfatidilcolina tenían la misma habilidad para unirse a los kininógenos. Sin embargo los anticuerpos sólo reconocían el complejo formado por los kininógenos y la PE¹⁰⁴ y no reaccionaban cuando los kininógenos formaban complejos con otros FL. Estos datos sugieren que la PE induciría cambios conformacionales específicos en los kininógenos que permiten su reconocimiento por parte de los aPE.

Proteínas C y S

La proteína C (PrC) es un inhibidor vitamina K dependiente que es activada por el complejo trombina-trombomodulina presente en la membrana de las células endoteliales. Luego de su activación, la PrC en presencia de proteína S (PrS) inactiva los factores VIII y V activados y de esta manera ejerce su acción antitrombótica.¹⁰⁵ En un estudio reciente se evaluó el efecto de las IgG obtenidas de 30 pacientes con aFL con o sin trombosis sobre la inactivación del factor Va mediada por la APC.⁶³ Los autores encontraron que en 7 casos las IgGs inhibían este mecanismo, en tres casos de manera independiente de la presencia de PrS y en los otros 4 dependiendo de

la misma. Además, pudieron separar los anticuerpos IgG que ejercían esta acción utilizando vesículas de CL-PrC o de CL-PrC-PrS. Estos resultados permitieron que los investigadores concluyeran que hay subpoblaciones de aFL que interaccionan específicamente con complejos de FL y proteínas del sistema antitrombótico de la proteína C-proteína S.

Pruebas de laboratorio para el estudio de los aFL

Los anticuerpos antifosfolípidos son una familia de inmunoglobulinas que pueden ser clasificadas en grupos diferentes de acuerdo al método usado para determinar su presencia (Tabla 3).

Tabla 3. Familia de anticuerpos antifosfolípidos.

• Reaginas
• Anticoagulante lúpico
• Anticuerpos antifosfolípidos aniónicos
Anticardiolipina
Antifosfatidilserina
Antifosfatidilinositol
Antiácido fosfatídico
• Anticuerpos antifosfolípidos neutros
Antifosfatidiletanolamina

La reconocida asociación de estos anticuerpos con distintas entidades clínicas ha producido una creciente demanda de su determinación de laboratorio. Sin embargo, la heterogeneidad de los aFL complica la correcta identificación de los mismos en el laboratorio. Actualmente se recomienda la realización de ensayos que involucran al sistema de coagulación y métodos inmunológicos para su correcta evaluación.

Por ensayos coagulométricos

Mediante este tipo de ensayos se evalúa la presencia del AL. De esta manera se mide la capacidad funcional de los anticuerpos de inhibir o interferir en las pruebas

de coagulación dependientes de FL. En 1983 por primera vez se propuso una serie de criterios para poder diferenciar a los inhibidores del tipo AL de aquellos que se caracterizan por neutralizar la actividad de un factor específico de coagulación.¹⁰⁶ Sin embargo estos criterios iniciales fueron insuficientes y más tarde el Subcomité de Estandarización del Anticoagulante Lúpico de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (107) publicó nuevos criterios que aún tienen vigencia.¹⁰⁸ Las recomendaciones se basan en el cumplimiento de cuatro pasos fundamentales en forma consecutiva:

- Identificar la prolongación en los tests de coagulación dependientes de FL
- Demostrar que esa anomalía es debida a la presencia de un inhibidor
- Confirmar la dependencia de FL del inhibidor o anticoagulante circulante
- Descartar que la alteración sea por la presencia de inhibidores específicos de algún factor de coagulación o por deficiencias de los mismos

Uno de los aspectos importantes en el diagnóstico del AL es conocer las variables preanalíticas que pueden influir los resultados de laboratorio. La preparación del plasma a estudiar es una de los puntos fundamentales a tener en cuenta para evitar la interpretación falsamente negativa de los resultados. Los plasmas del paciente y del normal a utilizar en las pruebas de corrección deben contener el menor número posible de plaquetas. El plasma pobre en plaquetas (PPP) puede obtenerse por doble centrifugación a alta velocidad o por medio de la filtración de los plasmas a través de filtros de 0,22 μm . En el trabajo de Sletnes y col.¹⁰⁹ se demostró que la eliminación de las plaquetas aumenta la sensibilidad de los tests de screening y los autores recomiendan el uso de la filtración de los plasmas si las muestras van a ser congeladas para un posterior análisis. Además encontraron que la ultracentrifugación no es un buen método para preparar el PPP porque la misma produce fragmentación plaquetaria.

1. La primera etapa del diagnóstico requiere la utilización de ensayos con alta sensibilidad para la detección del AL. Con este fin se utilizan pruebas de screening (Tabla 4) en las cuales la concentración de FL es lo suficientemente baja como para permitir la acción del inhibidor *in vitro*. En los primeros reportes^{10,11,24} en los cuales se identificó al AL, se utilizó el tiempo de coagulación del plasma. Sin embargo este ensayo tiene la desventaja de requerir el uso de plasma fresco. Posteriormente en el año 1983¹⁰⁶ se recomendó el uso del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) como screening porque en ese momento la definición del AL específicamente mencionaba la prolongación de ese test. Esta prueba presenta gran variabilidad en lo

que respecta a la sensibilidad para el AL debido al uso de diferentes reactivos comerciales. Entre los factores que afectan la sensibilidad de los mismos se encuentran principalmente la concentración y el tipo de FL y además el tipo de activador (particulado o soluble). Por ejemplo, se demostró que la sensibilidad es inversamente proporcional a la concentración de PS.¹¹⁰ En un trabajo reciente se comparó la sensibilidad de 16 reactivos de APTT comerciales y los resultados indican que los más sensibles parecen ser aquellos que utilizan FL derivados de cerebros de animales y sílice o ácido elálgico como activadores.¹¹¹ El uso de dos reactivos de APTT diferentes aumenta la probabilidad de detección del AL ya que en algunos casos el AL puede demostrarse con un reactivo y no con otro.¹¹² Los reactivos de APTT también varían en el grado de respuesta o de prolongación ante la presencia del AL.¹¹²

Tabla 4. Ensayos de screening.

APTT
dRVVT
dPT
Tiempo de coagulación con caolín
Tiempo de coagulación del plasma
Tiempo de Textarin
Tiempo de Taipan

Otro test de reconocida sensibilidad es el tiempo de coagulación con caolín que se realiza sin la adición de FL exógenos.^{113,114} El ensayo es ampliamente usado por su alta sensibilidad pero tiene la desventaja de ser muy sensible al número de plaquetas residuales en el plasma a estudiar.¹¹⁵ Por este motivo es imprescindible la filtración de los plasmas cuando se prepara el PPP. Uno de los ensayos de más amplia aceptación es el tiempo del veneno de víbora Russell (dRVVT) que usa FL diluidos y veneno de víbora como activador del factor X (Figura 1).¹¹⁶ El tiempo de protrombina con tromboplastina diluida (dPT) es un test conocido desde hace muchos años que ha resurgido como una prueba muy sensible desde la incorporación al mercado de las tromboplastinas recombinantes.^{112,117} Este nuevo reactivo utiliza una combinación de FL sintéticos y factor tisular recombinante lo que le confiere una sensibilidad superior al AL respecto a las tromboplastinas convencionales de origen humano o animal. En nuestra experiencia este ensayo usando tromboplastina recombinante es muy útil y en algunos casos (principalmente en pacientes con LES)

puede ser el único test positivo que antecede en varios meses los resultados positivos de otros ensayos. En los últimos años se han propuesto nuevos tests que utilizan venenos de víboras que tienen la propiedad de activar directamente a la protrombina en presencia de FL (Figura 1). Entre ellos se encuentran el tiempo de Textarin¹¹⁸ y el tiempo de Taipan¹¹⁹ que parecen ser muy sensibles al AL.

Varios estudios compararon la sensibilidad de los distintos tests propuestos para la detección del AL y la conclusión general es que se necesita la realización de al menos dos pruebas diferentes.^{112,115,122} Las diferentes combinaciones (por ejemplo APTT y dRVVT, APTT y dPT, etc.) permiten alcanzar una sensibilidad mayor del 90% en el diagnóstico del AL. Esto contrasta con la posibilidad de perder el 30% de los AL si se utiliza un solo test de screening.^{108,120,121} En la detección de nuestros pacientes usamos una batería de tests (APTT con dos reactivos, dRVVT y dPT) para aumentar la posibilidad de detectar al AL.

2. Luego de encontrar una prolongación en algunos de los tests de screening se debe documentar que esa anomalía es debida a un inhibidor y no a una deficiencia de factores. Para ello se deben realizar los estudios de mezclas del PPP del paciente con el PPP del normal. Un tema crucial para la correcta realización de los mismos es que el plasma del normal debe prepararse en la misma forma que el del paciente para evitar resultados falsos negativos (corrección). Las mezclas se preparan en dos proporciones diferentes de plasma del paciente y del normal (1:1) y (4:1). Esta última se recomienda especialmente en aquellos casos de inhibidores débiles que sólo prolongan mínimamente los tests de screening. Un problema importante es determinar que criterio usar para definir corrección o presencia de inhibidor. Hay tres criterios que se recomiendan:¹⁰⁸ diferencia de los tiempos de coagulación entre la mezcla y el normal, cociente entre los tiempos de coagulación de la mezcla y del normal y el índice de Rosner¹¹⁴ que es el cociente expresado en porcentaje entre la diferencia de los tiempos de coagulación de la mezcla y del normal y el tiempo de coagulación del paciente. Se sospecha la presencia de un inhibidor cuando el resultado de la mezcla en el test de screening es mayor que el valor de corte del criterio utilizado. En una evaluación reciente de los tres criterios que realizamos en plasmas con AL y en plasmas de pacientes deficitarios de factores de coagulación encontramos que los valores de corte en cada criterio dependen del reactivo usado y de la proporción de la mezcla. Por lo tanto hemos sugerido que éstos deben ser definidos en cada laboratorio considerando los reactivos que se utilizan. Además, el índice de Rosner pareció ser el más específico para diferenciar un inhibidor de una deficiencia de factores. En general se acepta que los AL son inhibidores de acción inmediata y esta característica los diferenciaría de los inhibidores que son tiempo y temperatura dependientes como el

inhibidor de factor VIII. Sin embargo se han reportado algunos AL que presentaban tiempo y temperatura dependencia.¹²¹

3. La etapa siguiente a la demostración de la presencia de un inhibidor es muy importante porque permite distinguir entre AL e inhibidores específicos de factores de la coagulación. Se dispone actualmente de varios tests de confirmación que se agrupan en cuatro categorías (Tabla 5). El primer grupo está formado por aquellos tests que usan una concentración disminuida de FL para acentuar el efecto del inhibidor. El test de inhibición de la tromboplastina tisular (TTI) se puede considerar un test de confirmación si el tiempo de protrombina con tromboplastina diluida se compara al mismo ensayo usando una concentración mayor o estándar de FL.

Tabla 5. Pruebas de confirmación.

• Concentración disminuida de FL
TTI
• Concentración aumentada de FL
PNP
Vesículas derivadas de plaquetas
Plaquetas activadas con ionóforo
Liposomas de PS
FL de cerebro de conejo
• FL de configuración alterada
PE en fase hexagonal
• Venenos de víbora con o sin dependencia de FL
Razón Textarin/Ecarin

El segundo grupo está compuesto por tests que usan una mayor concentración de FL para neutralizar el efecto inhibitorio. El más difundido es la prueba de neutralización con plaquetas (PNP) que utiliza como reactivo un lisado de plaquetas.¹²³ Esta es una prueba que presenta gran especificidad para AL. Este ensayo se utilizó inicialmente para corregir la prolongación del APTT, pero actualmente se usa también en el sistema del dRVVT. Otra forma de lograr el mismo efecto es utilizando plaquetas activadas con ionóforo, como las que empleó Thiagarajan y col. para el dRVVT.¹¹⁶ Arnout y col.¹²⁴ proponen la utilización de microvesículas derivadas de plaquetas. Independientemente del tipo de reactivo plaquetario que se utilice, se trata de ensayos con muy buena especificidad y sensibilidad que sólo presentan resultados falsos positivos en presencia de heparina o de inhibidores de

factor V. Otros investigadores han propuesto el uso de una alta concentración de FL de cerebro de conejo y la comparación de los resultados usando una concentración estándar y una cuatro veces mayor de FL.¹²⁵ También se pueden utilizar liposomas preparados con PS y fosfatidilcolina.¹¹⁰

El tercer grupo está basado en el hallazgo de Rauch y col.¹²⁶ quienes a través de la utilización de los FL en fase hexagonal pudieron diferenciar los inhibidores lúpicos de los inhibidores específicos contra factor VIII, ya que sólo los primeros fueron neutralizados. El test utiliza un reactivo de APTT sensible y PE en fase hexagonal. El ensayo es muy sensible y específico para el diagnóstico del AL. La necesidad de utilizar FL en fase hexagonal ha sido cuestionada por Stevenson y Seddon¹²⁷ porque ellos encontraron que tanto las plaquetas congeladas y descongeladas como los extractos de cerebro de conejo tienen la misma eficacia que las vesículas de PE para neutralizar el AL.

El otro grupo de ensayos de confirmación está integrado por los nuevos tests que usan venenos de víbora que activan a la protrombina, con diferente requerimiento de FL. El test de Textarin se puede considerar un ensayo confirmatorio si se usa en combinación con el test de Ecarin.¹¹⁸ Estos dos venenos activan directamente la protrombina nativa o decarboxilada y se diferencian en que el veneno de la *Pseudonaja textilis* (Textarin) necesita FL, calcio y factor V (sensible al AL) y en cambio el veneno del *Echis carinatus* (Ecarin) es independiente de esos componentes (insensible al AL). Por lo tanto la expresión de los resultados como un cociente de los tiempos de coagulación con ambos venenos genera un índice con alta sensibilidad para el AL.^{112,118}

Por métodos inmunológicos

Como se mencionó anteriormente es necesaria la evaluación de la presencia de aFL por medio de ensayos coagulométricos y también por métodos inmunológicos.¹²⁸ Estos últimos son generalmente ensayos de ELISA en los que se utiliza cardioplipina bovina como antígeno.²⁷⁻²⁹ El método estandarizado consiste en el pegado del FL a los pocillos de las placas de poliestireno por medio de una incubación de 16 horas a 4°C. Durante esa etapa de incubación el antígeno se pega a la placa por adsorción inducida por la evaporación del alcohol. Luego se realiza el bloqueo de los sitios de unión no específica por medio de una solución de suero bovino adulto (ABS). La incubación posterior con los sueros diluidos en solución de ABS permite que los aCL presentes en las muestras se unan a la CL inmovilizada. El agregado de antisueros

anti-inmunoglobulinas humanas conjugados con fosfatasa alcalina permite revelar a los aCL presentes en las muestras. El color desarrollado luego de añadir el sustrato cromogénico es proporcional a la cantidad de aCL presentes en el suero.

A pesar de ser un ensayo fácil de realizar, se han constatado varios problemas en la reproducibilidad de resultados, por lo que se realizaron varios estudios internacionales para lograr la estandarización del test.^{28,29,46} En el estudio de 1987²⁸ se propuso la utilización de estándares de calibración preparados a partir de sueros con aCL. Los resultados se expresan en unidades de aFL de isotipo IgG (GPL), MPL (para el isotipo IgM) o APL (para el isotipo IgA). Una unidad representa la actividad de unión a CL de 1 µg/ml de aCL purificados por afinidad. Además se recomienda la expresión de resultados en una forma semicuantitativa como se muestra en la Tabla 6. Esto permite una mejor comparación de los resultados entre laboratorios.

Tabla 6. Expresión de resultados (cuantitativa y semicuantitativa) en el ELISA para aCL.

<i>Isotipo</i>	<i>Unidad</i>	<i>Título</i>			
		<i>Negativo</i>	<i>Bajo</i>	<i>Moderado</i>	<i>Alto</i>
IgG	GPL	<10	10-20	20-80	>80
IgM	MPL	<10	10-20	20-80	>80
IgA	APL	<10	10-20	20-80	>80

Los niveles para la expresión de los resultados en forma semicuantitativa han sido elegidos arbitrariamente, a excepción del nivel de corte del ELISA que se determinó en sueros normales y corresponde aproximadamente al valor medio en unidades + 3 desviaciones estándar.²⁹ Actualmente existen nueve estándares para el ELISA de aCL para los isotipos IgG e IgM y seis para el isotipo IgA que están comercialmente disponibles. Estos deben utilizarse en cada placa para asegurar la validez del ensayo. Para la realización de la curva de estandarización [densidad óptica (DO) versus unidades] se recomienda usar un gráfico log-logit, aunque es posible utilizar también una curva log-log. Cuando la DO de una muestra es de un valor superior a la del estándar más alto se debe repetir el ensayo usando diluciones de la muestra. Esto se debe a la falta de linealidad y de precisión del ensayo a niveles muy

altos de aCL. La expresión de resultados en DO, número de desviaciones estándar por encima del promedio normal o múltiplos de la mediana no se recomienda por la variabilidad observada entre placas y la falta de linealidad del ensayo.²⁹ Hay un gran número de variables en este ensayo que deben tomarse en cuenta. El tipo de placas a utilizar es importante porque se han observado grandes diferencias en la reproducibilidad cuando se comparan diferentes tipos de placas.¹²⁹ Para el bloqueo se necesitan soluciones que contienen ABS o suero fetal bovino y no se recomiendan soluciones con gelatina o albúmina bovina (BSA).²⁶⁻²⁸ A pesar de la existencia de reportes¹³⁰ que recomiendan usar detergentes como el Tween 20 en las soluciones de lavado y diluyente de muestras, es importante recordar que el detergente invalida el ensayo de aCL al despegar el FL unido a la placa.¹³¹

La determinación de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas es necesaria porque aunque la mayoría de los sueros aCL positivos son de isotipo IgG y algo menos de IgM, hay casos de pacientes que sólo presentan positividad para uno de ellos.⁴⁷ Respecto al isotipo IgA hay resultados contradictorios y algunos autores no recomiendan la incorporación de este isotipo al screening de aCL.¹³² Debido a que la presencia de aCL puede ser transitoria (generalmente asociados a infecciones), es imprescindible la confirmación de un resultado positivo a las 6-8 semanas para evaluar la persistencia o no de los mismos.

Los aFL pueden ser también evaluados por ensayos de ELISA usando otros FL como antígeno en lugar de la CL. Estos ELISAs surgieron con el objetivo de explicar la discrepancia ya relatada entre las actividades de aCL y de AL. Algunos estudios encontraron que los anticuerpos antifosfatidilserina (aPS) correlacionan mejor con el AL que los aCL.^{30,44} Sin embargo, otros autores informaron que no mejora la correlación con la incorporación de un ELISA para aPS.^{47,132} Los resultados de las técnicas de ELISA con tromboplastinas parciales de origen bovino¹³³ o humano⁴⁸ como antígeno tampoco indicaron que puedan reemplazar a la detección del AL. Varios grupos de investigadores recomiendan evaluar por ELISA la reactividad a otros FL aniónicos (PS, PI, ácido fosfatídico) en aquellos pacientes con complicaciones clínicas compatibles con SAF y resultados negativos para AL y aCL.^{48,134} Además, la detección de aPE es aconsejada por algunos autores que hallaron resultados positivos de aPE en la ausencia de aCL u otros aFL aniónicos.^{134,135} Los resultados de un estudio reciente¹³⁶ indican que el uso de una mezcla antigénica de CL, PS, PI y PE en el ELISA da la misma información que la determinación de los diferentes aFL por separado. Este ensayo podría resultar ventajoso en el screening de los aFL.

El ensayo de aCL da resultados positivos en pacientes con el SAF y también en pacientes con infecciones (por ejemplo sífilis). Con el objetivo de poder diferenciar los aCL de estos dos grupos de pacientes, se ha desarrollado un ELISA utilizando una mezcla de FL que en la opinión de los autores permite la identificación específica de los anticuerpos presentes en el SAF.¹³⁷

La técnica de citometría de flujo ha sido recientemente propuesta para la detección de aFL.¹³⁸ La ventaja de este método es su rapidez (60 minutos) y sensibilidad para la detección simultánea de anticuerpos dirigidos contra diferentes FL. Además permite evaluar simultáneamente los tres isotipos de inmunoglobulinas y la semicuantificación de los resultados.

Resumiendo, el diagnóstico por el laboratorio de la presencia de aFL requiere la realización simultánea de ensayos coagulométricos y de métodos inmunológicos. Esto es consecuencia de que la probabilidad de hallar resultados positivos para AL y aCL (u otros FL) en los pacientes con SAF es del 70% , mientras que en el 30% restante solamente se encuentra positivo el ensayo de AL o el ELISA. Además es imprescindible demostrar la persistencia en el tiempo de la positividad para establecer el diagnóstico de SAF.

Asociaciones clínicas

Los aFL pueden presentarse en diferentes circunstancias. Ellos están asociados a enfermedades autoinmunes, trombosis, pérdidas fetales recurrentes, tratamientos con ciertas drogas, infecciones recientes, enfermedades neoplásicas y también se presentan en personas normales.^{17,19,25,122,139} Actualmente se propone una clasificación simple de los aFL en inmunoglobulinas de tipo alloinmune y autoinmune (Tabla 7). En general los autoinmunes se presentan en pacientes con complicaciones clínicas y los alloinmunes en personas asintomáticas o con sintomatología no asociada al SAF.

Tabla 7. Clasificación de los aFL por el tipo de inmunoglobulina.

• <i>Autoimmune</i>	
Primario	Sin LES
Secundario	LES u otras enfermedades del tejido conectivo
Inducido por drogas	Fenotiazinas, quininas, quinidinas, etc.
• <i>Alloimmune</i>	
Infecciones	Virales, bacterianas, etc.
Neoplasias	Enfermedades linfoproliferativas, etc.

Síndrome antifosfolípido

El término SAF¹⁴⁰ fue propuesto posteriormente a la definición de síndrome de anticardiolipinas por Hughes y col.¹⁴¹ Este síndrome se utiliza para definir a los pacientes que presentan aFL (AL y/o aCL) en asociación con complicaciones clínicas, principalmente trombosis y/o pérdidas fetales. Los criterios diagnósticos se mencionan en la Tabla 8.

Tabla 8. Criterios para el diagnóstico de SAF.^{140,141}

<i>Clinicos</i>	<i>De laboratorio</i>
<ul style="list-style-type: none">• Trombosis venosa• Trombosis arterial• Pérdidas fetales recurrentes• Trombocitopenia	<ul style="list-style-type: none">• aCL IgG o IgM a título moderado o alto• AL positivo

Se define un SAF cuando el paciente presenta al menos una complicación clínica y algún aFL por el laboratorio. La presencia de AL o aCL debe ser confirmada en dos ocasiones con un período no menor de 6-8 semanas

En los primeros reportes los pacientes con estas características tenían LES. Más tarde, se observó que había pacientes con las características del SAF que no presentaban criterios de LES. Por lo tanto en 1988, Asherson propuso el nombre de SAF primario para denominar a este grupo de pacientes.¹⁴² En algunos casos se ha observado que algunos pacientes con SAF primario evolucionan con los años a LES.

Debido a la variedad de otras manifestaciones (livedo reticularis, anemia hemolítica, etc.) que se pueden encontrar en pacientes con SAF, Alarcón-Segovia y col.¹⁴³ recomiendan ampliar los criterios de inclusión para este síndrome. Es importante recordar que todas estas manifestaciones clínicas se presentan también como entidades propias en circunstancias no asociadas a los aFL.

Trombosis

La asociación de los aFL con trombosis fue reportada por primera vez en 1963.²⁴ Desde entonces varias publicaciones han remarcado la frecuente observación de esta asociación. En 1990, Love y Santoro¹⁹ realizaron una revisión de la literatura incluyendo aquellos estudios en los cuales el diagnóstico de laboratorio se basaba en criterios validados. Los resultados indicaron que aproximadamente el 40% de los pacientes con LES y aFL (AL y/o aCL) tenían una historia de trombosis venosa (TV), con una incidencia mucho más baja en pacientes con LES sin aFL. En pacientes con SAF primario la incidencia de trombosis varía del 25 al 50%.¹⁴⁴ Los sitios de trombosis en pacientes con SAF pueden ser en cualquier zona de la circulación venosa y arterial. Generalmente el 70% de las trombosis son venosas y el 30% se producen en el sistema arterial. Las trombosis venosas profundas y el tromboembolismo de pulmón son los sitios más frecuentes, aunque también se reportaron casos de trombosis en venas hepáticas, cavas, mesentéricas, etc. Las trombosis arteriales (TA) se producen generalmente en la circulación cerebral, aunque existen casos con otras localizaciones (coronarias, axilares, retinales, etc.). En un trabajo reciente se demostró una fuerte asociación entre TV y la presencia de AL en pacientes sin LES.¹⁴⁵ Sin embargo no se encontró asociación con los aCL. Resultados similares se hallaron en un estudio retrospectivo en pacientes con LES y TA, aunque también se halló una fuerte correlación entre aCL de isotipo IgM y/o AL y TV.¹⁴⁶ Los autores mostraron que el AL es el factor de riesgo más fuerte para ambos tipos de trombosis. Un estudio prospectivo realizado en Italia en 360 pacientes con aFL durante 4 años halló una alta incidencia de recurrencias de eventos trombóticos. Esta observación se relacionó especialmente con títulos elevados (>40 uGPL) de aCL de isotipo IgG.¹⁴⁷ Vaarala y col.¹⁴⁸ realizaron un estudio prospectivo durante 5 años en hombres con dislipidemias y observaron que los individuos con los títulos más altos de aCL-IgG tenían un riesgo mayor de desarrollar infarto de miocardio.

Complicaciones obstétricas

El primer reporte de la asociación entre la presencia de aFL y pérdidas fetales recurrentes data del año 1957.¹² Posteriormente, varias publicaciones han presentado evidencias que confirman esta asociación. Lockshin y col.³¹ sugirieron que los aCL eran más sensibles que el AL para identificar a las mujeres con LES y riesgo alto de pérdidas fetales. El título de los aCL sería importante según informes que enfatizan la falta de consecuencias clínicas cuando los aCL son de bajo título.^{140,149} Dentro del grupo de pacientes con LES, la prevalencia de complicaciones obstétricas (CO) varía del 46 al 77% en mujeres con aFL y del 5 al 13% en pacientes sin aFL.¹⁹ La presencia de aFL (aCL y/o AL) en pacientes con historia de CO sin LES varía del 5 al 50%.¹⁵⁰ Ginsberg y col.¹⁵¹ estudiando 42 mujeres con LES encontraron una asociación muy significativa entre la presencia de AL y/o aCL y una historia de pérdidas fetales. En su estudio además recomiendan la realización de varios tests para la detección de los aFL y la repetición de las determinaciones en más de una ocasión para identificar a las pacientes con alto riesgo.

Las complicaciones obstétricas que estas pacientes suelen presentar incluyen a los abortos espontáneos, muerte fetal intrauterina, retardo en el crecimiento fetal, etc. Sin embargo, un estudio reciente¹⁵² evaluó el tipo de CO en 76 mujeres con aFL y en 290 sin estos anticuerpos y encontró que la muerte fetal era mucho más frecuente en las mujeres con aFL. La especificidad de la muerte fetal por la presencia de aFL en pacientes con pérdidas fetales recurrentes fue del 76%. En el estudio prospectivo de Finazzi y col.¹⁴⁷ se concluyó que en las mujeres con aFL la probabilidad de tener CO en el embarazo era mayor (60%) en aquellas que tenían una historia previa de pérdidas fetales.

Trombocitopenia

La trombocitopenia es otra de las complicaciones frecuentemente encontradas en relación a los aFL. Se presenta en el 20-40% de los pacientes y es principalmente de grado moderado.^{153,154} La trombocitopenia de grado severo ($<50 \times 10^9/l$) no es un hallazgo común en estos pacientes y sólo se presenta asociada con las complicaciones hemorrágicas. Love y Santoro¹⁹ en su revisión de la literatura encontraron que los pacientes con LES y aFL tenían una prevalencia tres veces mayor de trombocitopenia que aquellos sin aFL (40% vs 10%). Por otra parte, los pacientes con SAF primario

tienen una frecuencia de trombocitopenia muy similar a la de los pacientes con SAF y LES.¹⁵⁵

Otras manifestaciones clínicas

Las lesiones valvulares cardíacas son otra de las complicaciones clínicas que pueden ser halladas en relación a los aFL. Están localizadas frecuentemente en la válvula mitral y se detectan como vegetaciones no bacterianas o engrosamiento valvular. Se presentan en el 50% de los pacientes con LES y aFL y en el 30% de los pacientes con SAF primario.¹⁵⁶ Las complicaciones cutáneas también se han reportado en asociación con los aFL.¹⁵⁶ El espectro de las mismas es muy amplio e incluye livedo reticularis, úlceras en miembros inferiores, púrpura necrotizante, tromboflebitis, isquemia cutánea distal, etc. La etiología de estas manifestaciones parecería ser trombosis en los vasos cutáneos.

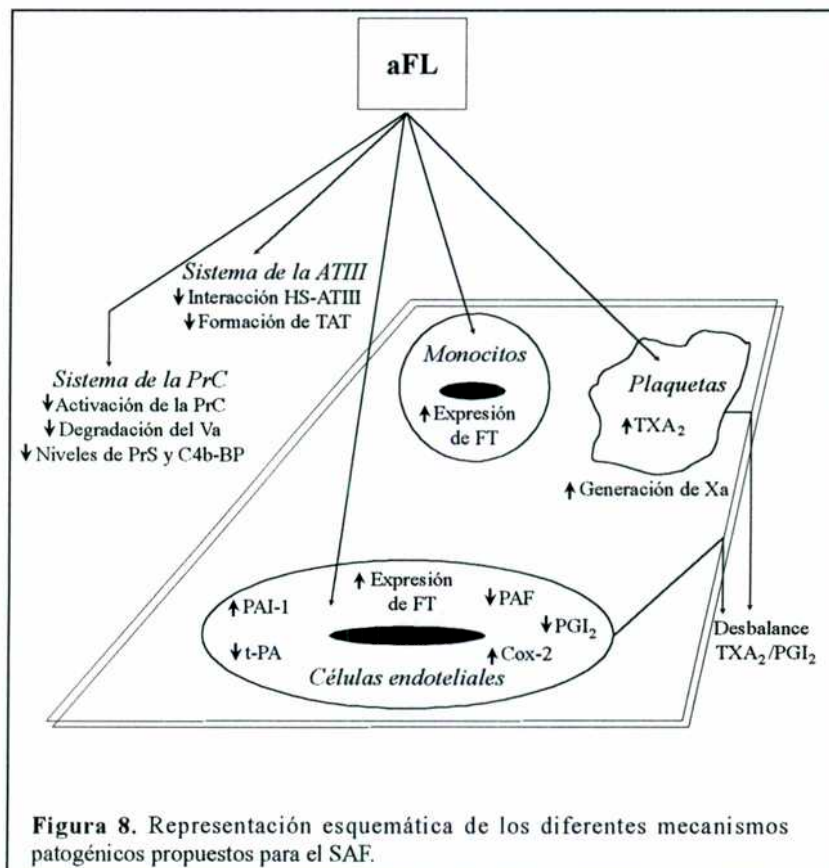
Infecciones y tratamientos con drogas

Niveles elevados de aCL se encuentran frecuentemente en pacientes con diferentes enfermedades infecciosas. El AL puede también ser detectado en algunos casos. Las infecciones asociadas a aFL son sífilis,¹⁵ hepatitis C,¹⁵⁷ mononucleosis infecciosa, infecciones a micoplasma, a virus de la inmunodeficiencia humana,¹⁵⁸ etc. En la mayoría de los casos los anticuerpos son de isotipo IgM y desaparecen con la resolución de la infección. Sin embargo, el isotipo IgG puede hallarse frecuentemente.

En algunos casos la aparición de aFL se asocia con la terapia con ciertas drogas. Las más comunmente halladas son la clorpromazina¹⁷ y otras drogas del grupo de las fenotiazinas. Estos anticuerpos se presentan generalmente en los tratamientos crónicos (mayor de 1 año) y son mayoritariamente de isotipo IgM. Los aFL relacionados a infecciones o a ciertas drogas se caracterizan por no asociarse con las complicaciones clínicas del SAF.

Mecanismos patogénicos

Las asociaciones de los aFL con las complicaciones clínicas mencionadas anteriormente sugieren que estos anticuerpos pueden jugar un rol fundamental en la fisiopatología del SAF. Teniendo en cuenta que los FL y las proteínas que unen FL tienen un papel crucial en el mantenimiento de la hemostasia y están involucrados en una variedad de funciones celulares, varios mecanismos patogénicos de los aFL han sido postulados. Estos se esquematizan en la Figura 8.



Es aún desconocido 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 FL aniónicos y de esta manera estos complejos se comportarían como inmunógenos. Este mecanismo indicaría que los aFL deberían ser considerados como marcadores de un estado protrombótico. Sin embargo, varias observaciones indicarían que los aFL no sólo serían marcadores sino que también

contribuirían al desarrollo de las complicaciones clínicas ya mencionadas. Las observaciones que proveen los datos más directos son aquellas obtenidas por los estudios que utilizan modelos animales, como se comentará más adelante.

Efecto sobre la síntesis de eicosanoides de las plaquetas y células endoteliales

Los eicosanoides son formados a partir del ácido araquidónico liberado de los FL de la membrana celular por acción de la fosfolipasa A₂ (Figura 9). Luego, el ácido araquidónico es transformado por las ciclooxigenasas en endoperóxidos cíclicos que derivan en la producción de tromboxano A₂ (TXA₂) (principal metabolito en plaquetas) y en prostaciclina (PGI₂) (principal metabolito en células endoteliales). El TXA₂ es un importante agonista de la agregación plaquetaria y tiene una potente acción vasoconstrictora. Por el contrario, la PGI₂ es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y es vasodilatador. La producción de PGI₂ parece tener un rol muy importante en las propiedades antitrombóticas del endotelio. Ambos metabolitos tienen efectos potentes y opuestos sobre la activación plaquetaria y el tono vascular, por lo tanto la alteración del equilibrio normal en la producción de estos eicosanoides podría tener relevancia en el desarrollo de enfermedades trombóticas.¹⁵⁹

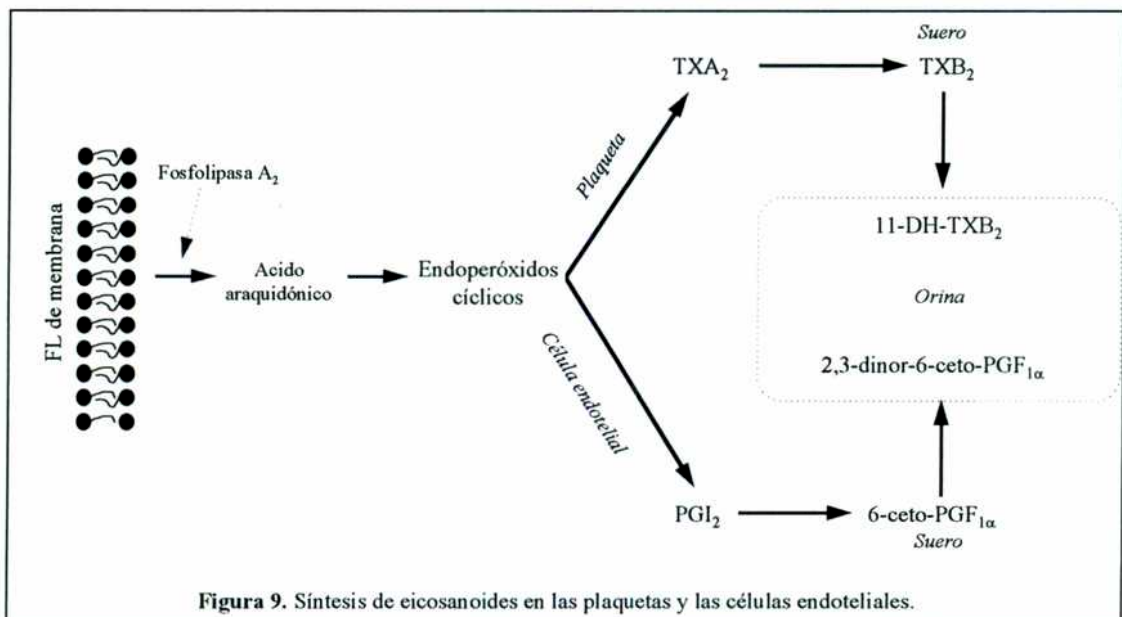


Figura 9. Síntesis de eicosanoides en las plaquetas y las células endoteliales.

En 1981, Carreras y col.¹⁶⁰ demostraron que la fracción IgG de una mujer con AL, trombosis y muerte fetal intrauterina recurrente era capaz de interferir con la producción de PGI₂ en sistemas de anillos de aorta de rata, miometrio humano y células endoteliales bovinas en cultivo. Los autores postularon que los aFL interferían con la liberación de ácido araquidónico porque observaron que el efecto inhibitorio se neutralizaba con el agregado del mismo. Resultados similares fueron hallados en otros estudios, aunque no todos los plasmas conteniendo anticuerpos con actividad de AL eran capaces de reducir la formación de PGI₂.^{161,162} En algunos reportes se encontró además una fuerte asociación entre la inhibición de la síntesis de PGI₂ y la historia de trombosis arterial.¹⁶² Recientemente se presentaron evidencias de que algunos aFL purificados inhibían la generación de PGI₂ y del factor activador de plaquetas (PAF) en células endoteliales intactas.¹⁶³ Estos resultados sugirieron que los aFL podrían reaccionar con los FL que son los sustratos de la fosfolipasa A₂ o interferir directamente con las actividades de la enzima. Sin embargo, existen otros trabajos que no hallaron un efecto inhibitorio y más aún, algunos observaron un efecto estimulador de los aFL sobre la síntesis de PGI₂ por células endoteliales humanas en cultivo.^{164,165} Las discrepancias existentes entre los diferentes estudios pueden ser explicadas por la diversa metodología empleada en los mismos.

Los eicosanoides TXA₂ y PGI₂ son químicamente inestables y sufren una hidrólisis rápida a tromboxano B₂ (TXB₂) y 6-ceto-PGF_{1α} (Figura 9). El TXB₂ es transformado en 2,3-dinor-TXB₂ y 11-dehidro-tromboxano B₂ (11-DH-TXB₂) para luego ser eliminados por orina. Por el otro lado, el 6-ceto-PGF_{1α} es hidrolizado a 2,3-dinor-6-ceto-PGF_{1α} y también eliminado por orina. Se ha demostrado que la medición de la excreción urinaria de 11-DH-TXB₂ (de origen plaquetario) y 2,3-dinor-6-ceto-PGF_{1α} (de origen vascular) es un fiel indicador de la biosíntesis de estos eicosanoides.¹⁶⁶ Algunos investigadores han aprovechado la ventaja de esta metodología para determinar el efecto *in vivo* de los aFL.¹⁶⁷ En ese estudio se midió la excreción urinaria de los principales metabolitos de TXA₂ y PGI₂ en 25 pacientes con AL y aCL y se encontró un aumento muy significativo de los metabolitos derivados de plaquetas con un aumento mucho menor de los derivados del endotelio. De esta manera se observó un desbalance en la relación TXA₂/PGI₂ (Figura 8). Estos resultados fueron encontrados durante el seguimiento de un año de los pacientes sugiriendo que la activación plaquetaria *in vivo* era un fenómeno permanente. Para confirmar el origen plaquetario de los metabolitos del tromboxano se trató a seis pacientes con dosis bajas de aspirina (20 mg/día por 7 días) y se observó que el balance se restablecía al término de ese período como consecuencia de la inhibición

específica de la ciclooxigenasa plaquetaria. Otros autores encontraron aumentos similares en la biosíntesis de tromboxano en pacientes con aCL de isotipo IgG.¹⁶⁸

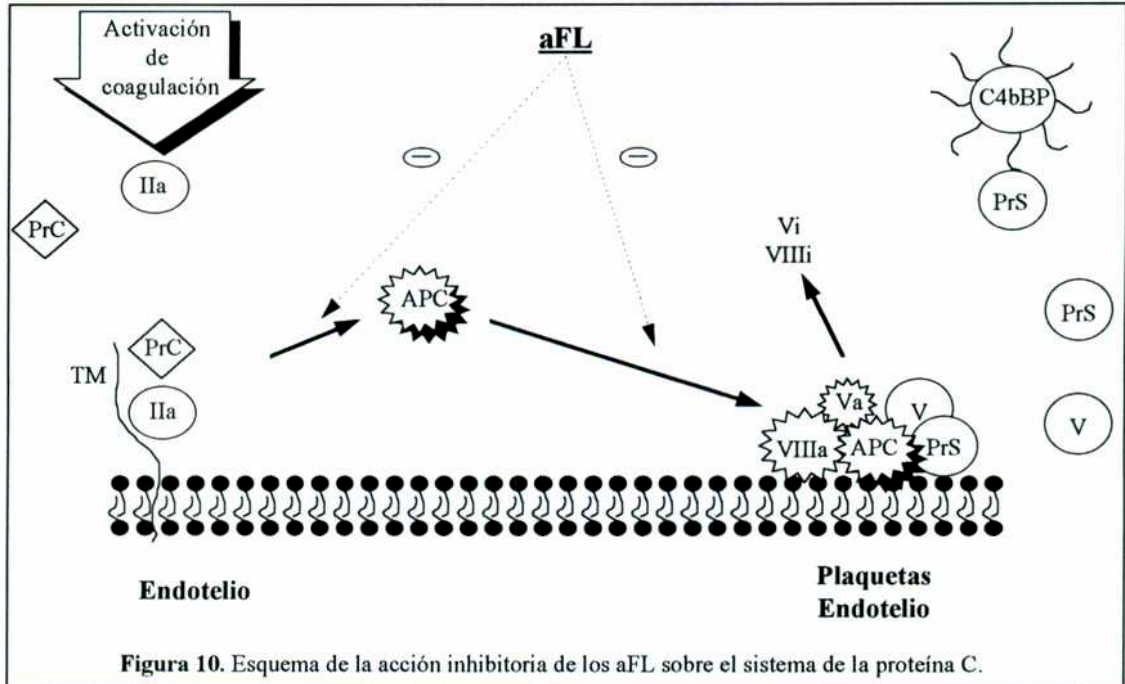
Varios estudios *in vitro* evaluaron el efecto de los aFL sobre la actividad plaquetaria. Se ha informado que los sueros de algunos pacientes con LES y aFL incrementaban la producción de TXB₂ por las plaquetas estimuladas con colágeno o ácido araquidónico.¹⁶⁴ Además se demostró que aCL purificados de conejo eran capaces de activar las plaquetas humanas no estimuladas induciendo la formación de TXB₂.¹⁶⁹ Recientemente utilizando los fragmentos F(ab')₂ de las IgG de pacientes con aFL se encontró un efecto potenciador directo sobre la activación de las plaquetas humanas lavadas y estimuladas con concentraciones subumbrales de trombina.¹⁷⁰ Por el contrario Shi y col.¹⁷¹ no encontraron ningún efecto de los aFL sobre la agregación y secreción plaquetaria. En este último estudio se mostró además que los anticuerpos purificados con actividad de AL y los que tenían actividad de aCL podían unirse solamente a las plaquetas activadas. Sin embargo para los aCL la capacidad de unión a plaquetas era estrictamente dependiente de la presencia de β₂GPI. Un grupo de investigadores evaluó el efecto de los aCL purificados por afinidad de pacientes con SAF o con sífilis y halló diferencias en su acción sobre las plaquetas.¹⁷² Encontraron que las IgG de pacientes con SAF inducían agregación en presencia de distintos agonistas y activación de las plaquetas determinada por citometría de flujo. Por el contrario las IgG de pacientes con sífilis no tenían ningún efecto.

Recientemente, en cultivos de células endoteliales humanas, se evaluó la acción de los aFL sobre la expresión de las ciclooxigenasas.¹⁷³ Se demostró que los aFL no modificaban la expresión de la ciclooxigenasa constitutiva (Cox-1) pero en cambio estimulaban la síntesis de la ciclooxigenasa inducible (Cox-2) a pesar de no generar aumentos muy significativos en la formación de PGI₂. El aumento de esta isoenzima fue demostrado evaluando la expresión de la proteína y del RNA mensajero. La inducción observada era dependiente de la concentración de IgG de los pacientes con SAF en el medio de cultivo. Aún se desconoce la significación *in vivo* de estos hallazgos pero podrían indicar que los aFL no anulan el potencial de las células endoteliales para generar PGI₂ y esto puede tener relevancia en la respuesta a eventos trombóticos agudos.

Efecto sobre el sistema antitrombótico de la proteína C/proteína S

La activación del sistema de coagulación, mencionada en la primera parte de esta introducción (Figura 1), es regulada fisiológicamente por varios sistemas de

control que permiten mantener la fluidez de la sangre y evitar la formación de trombos. Uno de los más importantes es el sistema de la proteína C,¹⁷⁴ el que se muestra esquemáticamente en la Figura 10.



La trombina generada por la activación de la coagulación se une a un receptor proteico presente en la superficie del endotelio denominado trombomodulina. De esta manera se altera la especificidad de sustrato de la trombina que ya no es capaz de activar plaquetas o convertir el fibrinógeno en fibrina. Por el contrario, inicia la activación del sistema inhibitorio de la PrC. La trombomodulina (TM) es sintetizada y expresada en las células endoteliales, pero una pequeña parte es secretada al medio plasmático.¹⁷⁵ La PrC se transforma en proteína C activada (APC), liberando un péptido de 12 aminoácidos, por la acción proteolítica de la trombina unida a la TM.¹⁰⁵ La velocidad de esta reacción depende de la presencia de FL. La APC es una serino-proteasa con capacidad de inhibir la coagulación por medio de la proteólisis limitada de los cofactores Va y VIIIa inhibiendo la formación ulterior de trombina. La APC requiere para expresar su actividad la presencia del cofactor PrS y de superficies fosfolípídicas. Recientemente se ha demostrado la importancia de la PE en aumentar la actividad inhibitoria de la APC.¹⁷⁶ La PrS es una proteína con alta afinidad por FL y esta propiedad es importante en la interacción de la PrS con la APC sobre las membranas celulares. La PrS existe en el plasma en dos formas, unida a la proteína de unión a C4b (C4bBP) formando un complejo 1:1 no covalente y en forma libre. La

fracción libre representa el 30-40% del total circulante y es la forma activa del cofactor. Además la PrS tiene otras propiedades antitrombóticas independientes de la APC. Recientemente se estableció que la actividad de la APC requería además de otro cofactor identificado como el factor V (Figura 10).¹⁷⁷ Estudiando pacientes que presentaban resistencia a la PrC activada (APC-R), se demostró que la causa de la alteración era la presencia de una mutación en el factor V que afectaba el sitio de clivaje donde actúa la APC.¹⁷⁸ El factor V mutado (factor V Leyden) posee actividad procoagulante normal pero es resistente a la inactivación por la APC. Las deficiencias o alteraciones de los distintos componentes del sistema de la PrC se asocian a una predisposición trombótica, lo cual demuestra su importancia fisiológica.

En 1983, Comp y col.¹⁷⁹ encontraron que 2 de 7 IgG aisladas de plasmas con AL interferían con la activación de la PrC por el complejo trombina-TM. Los autores postularon que el efecto se debería a la presencia de anticuerpos dirigidos contra TM porque la inhibición observada era independiente de FL. Posteriormente varios grupos corroboraron la inhibición de la activación de la PrC usando TM purificada o células endoteliales como fuente de TM e IgG¹⁶⁵ o IgM¹⁸⁰ con actividad de AL. Sin embargo, otros autores no pudieron demostrar el mismo efecto.¹⁶² Un estudio reciente encontró que solamente 2 de las 46 IgG purificadas de diferentes pacientes con AL interferían con la activación de la PrC sobre células endoteliales en cultivo y los autores concluyeron que la inhibición de la activación de la APC por TM era un fenómeno poco frecuente en estos pacientes.¹⁸¹ Asimismo, la presencia de anticuerpos dirigidos contra TM no se pudo demostrar por técnicas de ELISA en pacientes con AL.¹⁸²

A pesar de los resultados contradictorios obtenidos en los estudios que evaluaron la acción de los aFL sobre la activación de la PrC, existe un consenso general de que estos anticuerpos ejercen una acción inhibitoria sobre la función de la APC (Figura 10). Se ha demostrado la importancia de la presencia de la PE en las membranas para que la APC ejerza su efecto inhibitorio. Por ello se sugirió que el efecto inhibitorio ejercido por los aFL podría ser consecuencia de la interferencia de estos anticuerpos en la unión de la APC a las superficies fosfolipídicas que contienen PE.¹⁷⁶ Otro estudio mostró que en esta interacción también juega un rol importante la β_2 GPI modulando la unión de la APC a los FL.⁷⁸ Se ha postulado que los aFL podrían aumentar la afinidad de la β_2 GPI por los FL y de esta manera inducir un estado protrombótico. Hay un gran número de estudios que mostraron un efecto inhibitorio muy significativo en la degradación del factor Va por la APC en presencia de IgG o IgM purificadas de plasma de pacientes con aFL.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Este efecto fue observado en la mayoría de los pacientes evaluados utilizando células endoteliales humanas en cultivo o sistemas purificados conteniendo APC, PrS y FL. Varios trabajos han

evaluado el fenómeno de la APC-R en pacientes con aFL y encontraron que el 30-40% de los mismos presentan esta alteración *in vitro* sin tener la mutación en el factor V.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ La APC-R adquirida ha sido relacionada principalmente a la presencia del AL. Como consecuencia la persistencia del factor Va en la circulación sanguínea generaría un estado de hipercoagulabilidad.

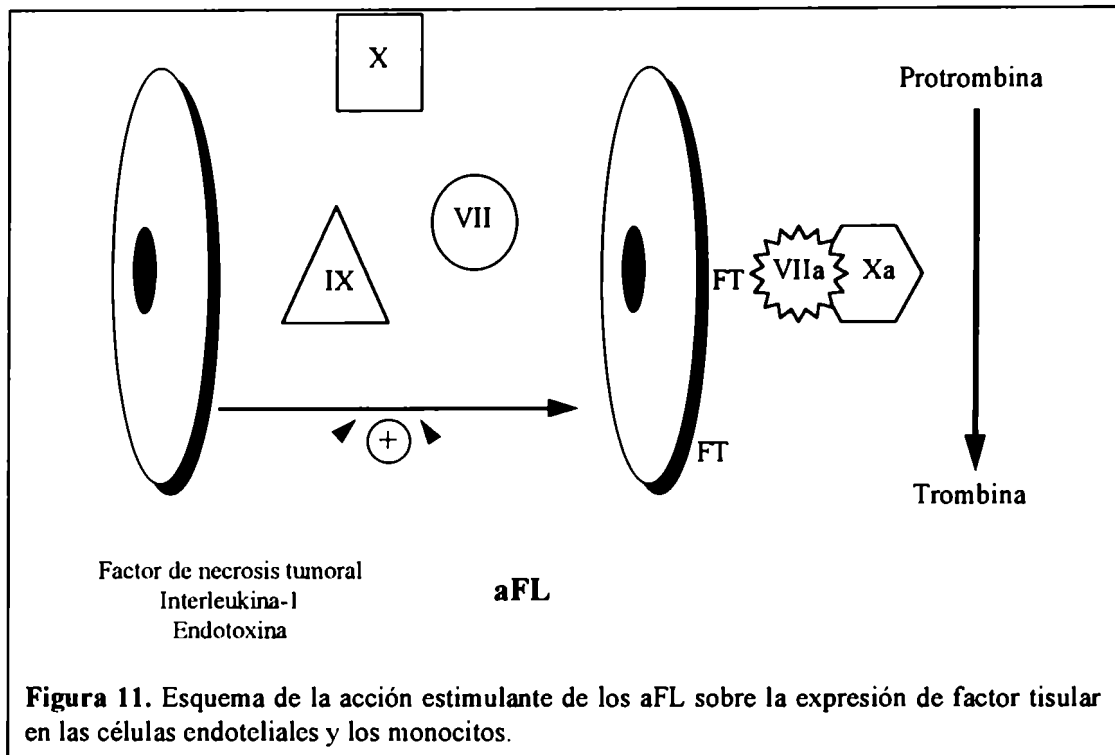
Otra de las alteraciones encontradas en los pacientes con aFL es la reducción en los niveles de la PrS.¹⁸⁹ Otros estudios no encontraron una correlación entre estos anticuerpos y la deficiencia adquirida de PrS. Sin embargo, en un estudio realizado en 73 pacientes encontramos que los aCL están relacionados a deficiencias de PrS total y libre, mientras que la presencia del AL se relacionó solamente con la disminución de PrS libre. Además encontramos una disminución importante en los niveles plasmáticos de C4bBP en los pacientes con aCL.¹⁹⁰

Estimulación de la actividad procoagulante de células endoteliales y monocitos

Como se mencionó anteriormente (Figura 1), la iniciación *in vivo* de la coagulación resulta del contacto de la sangre con el FT expresado en la superficie de las células. La expresión de FT en las células endoteliales y monocitos es inducida por una amplia variedad de agentes perturbadores de membranas celulares (endotoxinas, factor de necrosis tumoral, interleukina-1). El FT es una lipoproteína que para expresar su actividad requiere interaccionar con FL aniónicos como la PS. Como resultado final de esta activación se genera trombina y consecuentemente fibrina (Figura 11).

Varios estudios han mostrado que la expresión de la actividad procoagulante, mediada por el FT, de las células endoteliales humanas en cultivo se incrementa sinérgicamente por incubación de las mismas con sueros de pacientes con LES y factor de necrosis tumoral.¹⁹¹ Este aumento se asoció con la presencia de aFL (Figura 11). Más tarde, el mismo grupo de investigadores confirmó estos resultados y demostró que la potenciación de la actividad procoagulante (inducida por el factor de necrosis tumoral y los aFL) conducía a la formación de trombos en un modelo de trombosis *in vitro*.¹⁹² Estudios posteriores demostraron que los sueros de pacientes con SAF podían inducir directamente la expresión de FT en las células endoteliales humanas sin requerir la presencia de otros inductores.¹⁹³ También se ha descrito un efecto similar de la fracción IgG con actividad aCL sobre los monocitos,¹⁹⁴ a través

de una inducción que era dependiente de la síntesis proteica e independiente de los linfocitos T.



El mecanismo de inducción de la actividad de FT por los aFL es desconocido, pero una de las explicaciones propuestas es que estos anticuerpos al interactuar con los FL aumentan la influencia de los FL sobre la actividad del FT. Otra de las posibilidades es que los aFL inducen un aumento en la síntesis de la proteína del FT y de esa manera un aumento en la expresión celular del mismo. Ambas teorías no son excluyentes.

Inhibición del sistema fibrinolítico

La fibrinólisis es responsable de la remoción del coágulo de fibrina y la enzima participante es la plasmina generada a partir del plasminógeno. Esta conversión de plasminógeno en plasmina sobre la superficie de la fibrina es llevada a cabo por el activador tisular del plasminógeno (t-PA) o por la uroquinasa. El sistema fibrinolítico es regulado por el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) que inhibe el t-PA, el PAI-2 que inhibe la uroquinasa y la α_2 -antiplasmina que inhibe la plasmina. El t-PA, la uroquinasa y el PAI-1 son sintetizados en el endotelio. En la activación del

plasminógeno también juegan un rol importante los componentes de la fase de contacto de la coagulación (precalicreína, factor XII, etc.).

Algunos autores han encontrado una disminución de la capacidad fibrinolítica del endotelio en pacientes con LES, pero no relacionada con los aFL. Por el contrario, otros estudios hallaron una reducción significativa de la liberación del t-PA después de la oclusión venosa en pacientes con aFL.¹⁹⁵ El hallazgo más consistente en diferentes estudios es el aumento del PAI-1 plasmático.^{189,196,197} Sin embargo, la alteración en la fibrinólisis podría estar relacionada a la enfermedad de base (LES) que presentan la mayoría de los pacientes evaluados en esos estudios. Algunos artículos presentan evidencia de que los niveles aumentados del PAI-1 están vinculados con la presencia de aFL y son independientes del LES.¹⁸⁹ El aumento de este inhibidor de la fibrinólisis podría ser el reflejo de un estado inflamatorio, ya que esta proteína es reactante de fase aguda, y otra de las posibilidades sería una disminución en la inactivación del PAI-1 por parte de la APC como resultado de la inhibición de la actividad de la PrC por los aFL. En un trabajo reciente realizado en pacientes con LES y/o SAF se demostró que la mayor parte de ellos no presentaban alteraciones en los niveles de t-PA y PAI-1, pero sí mostraban una modificación importante en la variación diurna de los niveles de estos componentes.¹⁹⁸ La inhibición de la vía fibrinolítica dependiente de factor XII y precalicreína ha sido también demostrada en los pacientes con AL. La mayoría de los estudios no encontraron correlación entre la alteración de la fibrinólisis y una historia de trombosis. Hay un único estudio que demostró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles elevados del PAI-1 y la trombosis en pacientes con LES y AL.¹⁹⁷

Otros efectos sobre las plaquetas y las células endoteliales

Las plaquetas activadas contribuyen a la generación de factor Xa en su superficie. Recientemente se demostró que los aCL bloquean el efecto anticoagulante de la β_2 GPI en esta reacción,⁷⁷ por lo que la presencia de aCL favorecería el aumento de la generación de factor Xa y contribuiría a la tendencia trombotica observada en estos pacientes. Algunos autores estudiaron la prevalencia de anticuerpos antiplaquetas en pacientes con aFL y su relación con la trombocitopenia. Galli y col.¹⁹⁹ encontraron que en el 40% de los pacientes con aFL se detectan anticuerpos específicos contra las glicoproteínas Ib/IX y/o IIb/IIIa. Estos anticuerpos están presentes principalmente en los pacientes con trombocitopenia, aunque también se detectan en aquellos sin esta complicación. Por otro lado utilizando experimentos de

adsorción, demostraron que los anticuerpos anti-glicoproteínas de membrana plaquetaria eran diferentes de los aFL. Sin embargo, en un estudio más reciente se observó que un anticuerpo antifosfolípido monoclonal (IgG) presentaba reacción cruzada con la glicoproteína IIIa de plaquetas humanas.²⁰⁰

Otra de las propiedades antitrombóticas del endotelio involucra a los glicosaminoglicanos tipo heparina que están presentes normalmente en la superficie endotelial. El heparan sulfato (HS) posee actividad anticoagulante acelerando la acción de la antitrombina III (ATIII) en la inactivación de trombina y otras serino proteasas. Shibata y col.²⁰¹ postularon la hipótesis de que la presencia de anticuerpos contra HS o heparina contribuiría a la tendencia trombótica al bloquear la activación de la ATIII por estos glicosaminoglicanos. Estos autores demostraron que algunos aFL reaccionaban con una secuencia disacárida presente en la región de la heparina/HS responsable de la unión a la ATIII, y que la fracción IgG de algunos pacientes con aFL inhibían la formación de complejos trombina-ATIII (TAT) *in vitro*. Esto podría explicar, al menos en parte, el hallazgo *in vivo* de péptidos que señalan la existencia de actividad trombínica en los pacientes con SAF.²⁰²

Otros autores han focalizado sus estudios en el rol de los aFL sobre la liberación del antígeno de von Willebrand del endotelio. Ensayos *in vitro* demostraron que las IgG de pacientes con LES o SAF eran capaces de estimular la liberación de esta proteína de las células endoteliales de la vena umbilical humana en cultivo.²⁰³ Esto fue confirmado evaluando el nivel plasmático del antígeno de von Willebrand en pacientes con SAF, el cual se correlacionó positivamente con el título de aCL.¹⁹⁸

Diferentes grupos de investigadores han demostrado una alta frecuencia de anticuerpos anti-células endoteliales (aCE) en los sueros de pacientes con aFL. Los aCE son detectados por ensayos de ELISA utilizando monocapas de células endoteliales de la vena umbilical humana. Estos anticuerpos constituyen una familia de inmunoglobulinas que reaccionan con diferentes proteínas o FL presentes en la superficie de las células endoteliales. Datos más recientes indican que algunos aCE con actividad de aCL se unen a las células endoteliales solamente en la presencia de β_2 GPI.^{204,205} De esta manera, la β_2 GPI actuaría como mediador de la unión de los anticuerpos al endotelio. Como resultado de la interacción entre los aFL y las células endoteliales se produce la activación de estas células. Esto se manifiesta por la inducción de la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial.^{204,206} Estos resultados fueron obtenidos trabajando con IgG de pacientes con SAF y evaluando las moléculas de adhesión por estudios de microscopía de inmunofluorescencia y la adhesión de monocitos a las células endoteliales. En estos pacientes el aumento de la inducción de la adhesión de monocitos mediada por las

moléculas de adhesión es un marcador de la activación celular. Asimismo, la activación de células endoteliales conduce a la síntesis de la isoenzima inducible de la ciclooxigenasa (Cox-2).

La apoptosis representa la forma predominante de muerte celular y hay varios estudios que evaluaron la interacción de los aFL con las células apoptóticas. Una de las consecuencias del mecanismo de apoptosis es la redistribución de los FL de las membranas y la exposición de PS en la cara externa de las células. Los aFL tienen capacidad de unirse *in vitro* a células endoteliales, timocitos u otras células apoptóticas y se ha demostrado que la β_2 GPI tiene un rol muy importante al mediar en esta interacción.^{81,207,208} Esto pudo ser demostrado con aFL de pacientes con SAF, pero no con aquellos de pacientes con sífilis.²⁰⁸ Hay también algunos datos que sugieren que los aFL por sí mismos podrían inducir la apoptosis de las células endoteliales humanas.

Interferencia con las anexinas

Otro de los probables mecanismos patogénicos del SAF es la interferencia *in vivo* de los anticuerpos con las anexinas. Estas forman una familia de proteínas con alta afinidad por FL en una forma dependiente de calcio y tienen una localización predominantemente intracelular. La proteína anticoagulante placentaria tipo I o anexina V está presente especialmente en la placenta y el cordón umbilical.²⁰⁹ Tiene un efecto anticoagulante inhibiendo la reacción protrombinasa y compite con los aFL por la unión a los FL aniónicos.^{207,210} La anexina V se encuentra a bajas concentraciones en los fluidos extracelulares y se considera que su función principal es la de actuar como anticoagulante tisular (placenta). Los aFL y la anexina V tienen una gran similitud en su mecanismo de acción anticoagulante *in vitro* y este efecto es aditivo.²¹⁰ Por esta razón y considerando la localización placentaria de la anexina V, se ha sugerido que la interacción entre ambos podría ser importante en la patogénesis de las complicaciones obstétricas. Recientemente se realizaron algunos estudios para evaluar la localización y la cantidad de anexina V en las placentas de mujeres con aFL. Un estudio mostró que las placentas de mujeres con o sin aFL tienen una distribución comparable de anexina V y en cambio se encontró un aumento de β_2 GPI y de IgG en las placentas de pacientes con aFL.²¹¹ Por el contrario, Rand y col.²¹² demostraron una reducción significativa de anexina V en la superficie trofoblástica de la placenta de pacientes con SAF. Algunos experimentos realizados indicaron que la causa podría ser una interferencia de los aFL en el transporte de la proteína a la superficie y no una

disminución de la síntesis de la misma. La presencia de anticuerpos anti-anexina V fue también informada en algunas series de pacientes con LES y aFL.^{213,214}

Modelos animales del síndrome antifosfolípido

Una forma de demostrar si los aFL son patogénicos *in vivo* consiste en utilizar modelos animales y observar el desarrollo de las complicaciones clínicas. Uno de ellos es el modelo murino (NZWxBXSB) F1 que presenta una enfermedad tipo LES y se caracteriza por tener infarto de miocardio y trombocitopenia en asociación con los aCL.²¹⁵ La inmunización pasiva con la fracción IgG policlonal, de mujeres con pérdidas fetales y aFL, de ratas Balb/c embarazadas condujo a pérdidas fetales, resorción embrionaria y también produjo fetos y placentas de bajo peso.^{216,217} Resultados similares se obtuvieron por inmunización activa con un aCL monoclonal humano.²¹⁸ Recientemente se estudió la inyección pasiva de un anticuerpo antifosfatidilserina (aPS) monoclonal de isotipo IgM en ratas Balb/c o CD-1 embarazadas y se observó una disminución significativa en el peso de los fetos y de las placentas cuando se compararon con los resultados obtenidos con aCL monoclonal o IgM control.²¹⁹ Los autores sugirieron la importancia de los anticuerpos dirigidos contra PS en la inducción de complicaciones en el crecimiento fetal.

El rol de los aFL en el desarrollo de trombosis fue recientemente estudiado con un modelo murino que permite evaluar la dinámica *in vivo* de la formación del trombo luego de la injuria estandarizada en la vena femoral.²²⁰ En los ratones CD-1 inyectados pasivamente con IgG policlonal humana de pacientes con SAF se observó un aumento en el área del trombo y un retardo en la desaparición del mismo comparado con los resultados obtenidos con IgG normal. El mismo grupo de investigadores obtuvo resultados similares trabajando con fracciones de IgM e IgA. Olee y col.²²¹ examinaron los efectos de una IgG monoclonal humana obtenida de un paciente con aFL y trombosis y demostraron las propiedades trombogénicas del monoclonal en el mismo modelo murino. En un trabajo más reciente, Pierangeli y col.²²² demostraron que las propiedades trombogénicas también se observaban usando anticuerpos de origen murino. En este estudio se inmunizaron activamente los ratones con β_2 GPI, aCL-IgG o albúmina (todas las proteínas de origen humano). Los anticuerpos murinos producidos fueron anti- β_2 GPI y aCL en el primer grupo, aCL y anti-IgG humana en el segundo y anti-albúmina en el último. El área del trombo y la persistencia del mismo fueron mucho mayores en los ratones del primer y segundo grupo comparados con los del tercer grupo. Como no observaron diferencias entre los

ratones que desarrollaron anti- β_2 GPI y aCL respecto a los que sólo tenían aCL, los autores concluyen que los anti- β_2 GPI humana no tienen un efecto aditivo en el desarrollo de trombosis en el modelo murino.

Los modelos experimentales mencionados proveen evidencia directa del rol patogénico de los aFL en el desarrollo del daño fetal y de los fenómenos trombóticos. Además los modelos animales se están utilizando para evaluar la eficacia de diversos esquemas terapéuticos propuestos para el SAF.

**OBJETIVOS
DE
LA TESIS**

- ◆ Desarrollar enzimoimmunoensayos para la detección de anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I y anti-protrombina humanas.
- ◆ Determinar si los pacientes con anticuerpos antifosfolípidos presentan anticuerpos dirigidos contra estas proteínas purificadas.
- ◆ Estudiar si los anticuerpos de isotipo IgG purificados de pacientes con síndrome antifosfolípido y de aquellos con infecciones presentan distinta especificidad antigénica en ensayos *in vitro*.
- ◆ Evaluar las relaciones existentes entre las especificidades antigénicas estudiadas y las diferentes complicaciones clínicas del síndrome antifosfolípido.
- ◆ Evaluar la interferencia de los anticuerpos en la respuesta anticoagulante a la proteína C activada y la correlación con su especificidad antigénica.
- ◆ Desarrollar un método rápido para la purificación de los metabolitos urinarios del TXB₂ e investigar si la interferencia de los anticuerpos antifosfolípidos sobre la biosíntesis de eicosanoides de origen plaquetario está asociada a una determinada reactividad antigénica de los mismos.

**MATERIALES
Y
METODOS**

Obtención de muestras de sangre

Para obtener plasma se realizaron extracciones venosas y se recolectó la sangre en tubos plásticos que contenían citrato de sodio 0,11M en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas dos veces durante 10 minutos a 2500g y posteriormente fueron filtradas a través de filtros con poros de 0,22 μm de diámetro (Millipore Products Division, Bedford, MA, USA), para obtener el plasma pobre en plaquetas. El PPP fue utilizado inmediatamente para los ensayos de AL y además se congelaron fracciones de 1 ml del mismo a -70°C . Los sueros se obtuvieron recolectando la sangre en tubos de vidrio y, luego de una incubación de cuatro horas a 37°C para permitir la formación del coágulo, centrifugándolos a 1500g durante 10 minutos. Los sueros fueron conservados a -70°C hasta el momento de usar.

Recolección de muestras de orina

Las muestras de orinas de toda la noche (aproximadamente 8-10 horas) fueron recolectadas en la mañana, fraccionadas en el laboratorio en alícuotas de 50 ml y guardadas a -70°C . Ninguno de los 34 pacientes estudiados o de los 18 controles normales habían recibido drogas anti-inflamatorias no esteroideas ni otra medicación (con la excepción de dicumarínicos en los pacientes con historia de trombosis venosa) durante los 15 días previos a la recolección de la orina. Todos los sujetos evaluados eran no fumadores y tenían función renal y recuento de plaquetas dentro de límites normales. Antes del análisis se determinaron los niveles de creatinina urinaria por el método cromogénico de Jaffe.

Pacientes

Se estudió un grupo de 233 pacientes [83 hombres y 150 mujeres; edad media 40,7 años, rango (5 a 79 años)] que fueron seleccionados por presentar anticuerpos antifosfolípidos. Ellos fueron inicialmente evaluados en el laboratorio por tener una historia de complicaciones clínicas que habitualmente se asocian a la presencia de aFL o enfermedades autoinmunes. Además algunos pacientes fueron detectados en forma fortuita como resultado de los estudios de rutina del laboratorio. La población estaba compuesta por 77 pacientes con diagnóstico de LES (28 de ellos con complicaciones

clínicas compatibles con SAF secundario), 92 pacientes con SAF primario y 64 que constituían el grupo de misceláneas (enfermedad valvular cardíaca, neoplasias, exposición a drogas o asintomáticos). Los eventos de trombosis venosa fueron documentados por estudios de doppler o venografía; los de tromboembolismo de pulmón por centellograma de ventilación-perfusión o angiografía pulmonar y los de accidente cerebrovascular isquémico por tomografía computada o resonancia magnética nuclear. Los criterios para considerar la historia de complicaciones obstétricas fueron: 2 o más abortos espontáneos o al menos una pérdida fetal. El aborto espontáneo es definido como una pérdida de embarazo antes de la semana 20 de gestación y una pérdida fetal como una pérdida de embarazo después de 20 semanas de gestación. El diagnóstico de trombocitopenia fue definido cuando los pacientes presentaban un recuento de plaquetas inferior a $10^{11}/l$.

Tabla 9. Complicaciones clínicas en los distintos grupos de pacientes con aFL.

	<i>Complicaciones clínicas (n)</i>			
	<i>TV</i>	<i>TA</i>	<i>CO</i>	<i>Trombocitopenia</i>
Población total n=233	45	32	44	13
SAF primario n=92	39	30	27	8
SAF secundario n=28	6	2	17	5
LES sin SAF n=49				
Misceláneas n=64	-	-	-	-

Grupos controles sin aFL: 50 pacientes con LES, 25 con historia de TV y 25 con historia de CO. El grupo de 80 personas sanas fue seleccionado de acuerdo al Panel de Expertos en Teoría de los Valores de Referencia de la Federación Internacional de Química Clínica.^{222bis}

Grupos de pacientes con infecciones: 55 pacientes con diagnóstico de sífilis, quienes fueron positivos en el test de VDRL y en los ensayos de FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption) o de TPHA (Treponema Pallidum Haemagglutination). Además 18 pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Ninguno de los pacientes con enfermedades infecciosas tenía historia de complicaciones clínicas relacionadas al SAF, con la excepción de trombocitopenia en el caso de algunos con HIV.

Detección del anticoagulante lúpico

La actividad de AL en plasma se evaluó usando dos ensayos de coagulación para el screening: APTT con los reactivos Actin FSL (Dade International Inc, Miami, FL, USA), Platelin LS (Organon Teknika, Turnout, Belgium) y/o PTT-LA (Diagnostica Stago, Asnières, France) y dRVVT utilizando cefalina de cerebro de conejo y veneno de víbora Russell de Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). La presencia de un inhibidor fue considerada cuando se obtenía prolongación de los tiempos de coagulación que no corregían al realizar las mezclas del plasma del paciente con PPP normal en las proporciones 1:1 y 4:1 (paciente:normal). La confirmación de la presencia del AL se realizó mediante la PNP en los ensayos de APTT y dRVVT y con el TTI usando la tromboplastina tisular recombinante Innovin (Dade International) sin diluir y diluida 1:500 en solución de Cl_2Ca 0,025M. En algunos casos se utilizó además el ensayo de confirmación Textarin/Ecarin. La presencia del AL fue considerada cuando al menos uno de los ensayos de screening y uno de los de confirmación fueron positivos, teniendo en cuenta los criterios previamente establecidos.^{108,112,115}

Detección de anticuerpos anticardiolipina

Los aCL (IgG e IgM) fueron medidos por la técnica de ELISA previamente estandarizada.²⁹ Se utilizaron placas de poliestireno (Linbro Titertek, ICN-Biomedicals, Horshem, USA) que fueron incubadas toda la noche a 4°C con 30 μl /pocillo de una solución de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cardiolipina bovina (Sigma) en etanol. Posteriormente al lavado de las placas dos veces con buffer fosfato salino (PBS) (KH_2PO_4 1mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8mM, NaCl 136mM, KCl 2mM) de pH 7,4, se realizó el bloqueo durante una hora con 75 μl /pocillo de una solución de ABS

(Sigma) al 10% en PBS. Luego de tres lavados con PBS se añadieron 50 μ l/pocillo (en triplicado) de la dilución del suero 1:50 en PBS-ABS 10%. Luego de una incubación de una hora a temperatura ambiente se lavaron las placas tres veces con PBS y se añadieron 50 μ l/pocillo de una dilución 1:1000 de antisuero de cabra anti-IgG o anti-IgM humana marcado con fosfatasa alcalina (Sigma) en PBS-ABS 10% los que se incubaron durante una hora. Después de tres lavados con PBS se reveló la reacción enzimática añadiendo 50 μ l/pocillo de una solución de 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato (Sigma) en buffer dietanolamina (Sigma) pH 9,8. La reacción se detuvo con 75 μ l/pocillo de NaOH 3M cuando el control positivo más alto alcanzó una absorbancia de 0,8-1,0. La DO se leyó a 405 nm utilizando el MS2 Titertek Plus Microplate Reader (ICN-Flow, ICN-Biomedicals, Costa Mesa, USA). Para cada muestra el valor de DO considerado se obtuvo descontando la absorbancia medida en los pocillos controles de unión no específica (solución de etanol sin antígeno). Para la curva de calibración se usó el set de 9 estándares internacionales (Louisville APL Diagnostics, Louisville, USA) y nuestros propios sueros control. La curva se construyó graficando las lecturas de DO de los diferentes estándares versus su concentración en unidades utilizando una función log-log. Los resultados se expresaron en unidades GPL (para IgG) y MPL (para IgM). Se utilizaron los siguientes valores de referencia: < 7 uGPL o MPL (negativo), entre 7-20 (positivo débil), entre 20-80 (positivo moderado) y > 80 (positivo fuerte).

ELISAs modificados para la detección de aCL de isotipo IgG

Efecto del ABS

Para evaluar la importancia del ABS como componente del ELISA para aCL se compararon las absorbancias obtenidas en el ensayo estándar de aCL para isotipo IgG y aquellas obtenidas cuando se utilizaba PBS-BSA 1% como solución bloqueante y diluyente de muestras. Esto fue realizado en 35 pacientes con SAF y títulos moderados o fuertes de aCL-IgG y en 37 pacientes con sífilis y aCL positivos. Los resultados se expresaron como cocientes de DO (con ABS) / DO (con BSA).

Efecto de la β_2 GPI

En 10 pacientes con SAF y en 10 con sífilis se evaluó el efecto de la presencia de la β_2 GPI en el ELISA. Para ello se compararon las absorbancias obtenidas en el ELISA modificado (PBS-BSA 1%) con aquellas obtenidas cuando se añadió β_2 GPI a las soluciones bloqueante y diluyente a concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

Efecto del cofactor endógeno

Se evaluó en 8 pacientes con SAF y en 8 con sífilis. Se determinó comparando las absorbancias obtenidas cuando se usaba la dilución de suero estándar (1:50) con aquellas obtenidas cuando se usaba una dilución mayor (1:200). Esto se realizó para cada muestra en ambos ELISAs (estándar-ABS y modificado-BSA) y los resultados para cada dilución se expresaron como cocientes de DO (con ABS) / DO (con BSA).

Detección de anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I

Se utilizó un ensayo de ELISA en el cual se usaron placas de poliestireno (Nunc-Immunoplate, MaxiSorp, Kamstrup, Denmark) irradiadas con rayos de electrones a una dosis de 100 kGy (Realizado en la Comisión Nacional de Energía Atómica, Ezeiza, Argentina). En la primera etapa se realizó el pegado del antígeno añadiendo 50 μl /pocillo de la solución de β_2 GPI a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ en PBS e incubando toda la noche a 4°C. La β_2 GPI humana purificada fue gentilmente provista por el Dr. H. Haupt (Behringwerke AG, Marburg, Germany) y se demostró la ausencia de fosfolípidos contaminantes en esta preparación por medio de la medición colorimétrica del contenido de fósforo (sensibilidad ≥ 1 μg de fosfato).²²³ Luego de esta etapa se realizaron tres lavados (150 μl /pocillo) con PBS-Tween 20 0,1% y se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos con 100 μl /pocillo de una solución de BSA (Sigma) al 10% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados, se añadieron 50 μl /pocillo en duplicado de la dilución 1:100 de los sueros en el diluyente del ensayo (PBS-BSA 1%-Tween 20 0,1%). Un suero control de conejo anti- β_2 GPI humana diluido 1:2000 fue añadido como control positivo del pegado del antígeno. Las placas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente y luego de tres lavados se añadieron 50 μl /pocillo de antisuero [fragmento F(ab')₂] de conejo anti-IgG o anti-IgM humana marcado con peroxidasa

(Sigma) diluido 1:4000 en diluyente. Para el control positivo se usó una dilución 1:10000 de un antisuero anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma). Posteriormente a una incubación de una hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados y se desarrolló el color de la reacción añadiendo 50 μ l/pocillo de una solución de 0,5 mg/ml de o-fenilendiamina (Sigma) en buffer citrato-fosfato pH 5,0 conteniendo H_2O_2 . La incubación se realizó a temperatura ambiente en la oscuridad durante una hora y se detuvo la reacción con 50 μ l/pocillo de H_2SO_4 3M. Las DO fueron leídas a 492 nm en un MS2 Titertek Plus Microplate Reader. El valor neto en DO para cada muestra se obtuvo luego de sustraer la absorbancia del blanco de reacción y la obtenida en los pocillos para unión no específica.

Detección de anticuerpos anti-protrombina

Se desarrolló un ELISA utilizando placas de poliestireno (Nunc-Immunoplate, MaxiSorp). Se añadieron 50 μ l/pocillo de una solución de protrombina humana purificada (Stago) a una concentración de 10 μ g/ml en PBS. Luego de una incubación durante toda la noche a 4°C para permitir el pegado del antígeno, se realizaron tres lavados (150 μ l/pocillo) con PBS-Tween 20 0,1% y se bloquearon los sitios inespecíficos con 100 μ l/pocillo de una solución de BSA (Sigma) al 10% en PBS-Tween 20 0,1% durante una hora a temperatura ambiente. Luego de otros tres lavados, se añadieron 50 μ l/pocillo de la dilución 1:100 de los sueros en el diluyente del ensayo (PBS-BSA 1%-Tween 20 0,1%). La dilución de los sueros se agregó en duplicado en los pocillos con y sin antígeno (pocillo control de cada muestra). Como control positivo se utilizó un suero control de conejo anti-protrombina humana (Stago) diluido 1:2000. Después de la incubación durante una hora a temperatura ambiente, se procedió al lavado de la placa y al agregado de 50 μ l/pocillo de una dilución 1:4000 del antisuero [fragmento F(ab')₂] de conejo anti-IgG o anti-IgM humana marcado con peroxidasa (Sigma). Para el control positivo se usó como conjugado una dilución 1:10000 en el diluyente de un antisuero anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma). Luego de la incubación de una hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados y se procedió a revelar el color de la reacción añadiendo 50 μ l/pocillo de solución de 0,5 mg/ml de o-fenilendiamina (Sigma) en buffer citrato-fosfato pH 5,0 conteniendo H_2O_2 . El desarrollo de color se llevó a cabo a temperatura ambiente en la oscuridad durante una hora y se detuvo la reacción con 50 μ l/pocillo de H_2SO_4 3M. El MS2 Titertek Plus Microplate Reader fue usado para leer las DO a 492 nm. Luego de descontar el valor de la lectura del blanco, se

calcularon los valores netos de DO de cada muestra sustrayendo la absorbancia obtenida en los pocillos para unión no específica (pegado con PBS).

Detección de autoanticuerpos por dot blotting

Se utilizó membrana de nitrocelulosa previamente hidratada con agua destilada y el exceso de humedad fue eliminado entre papeles de filtro. La membrana fue cortada en tiras y se marcaron tres círculos para la siembra en cada una. Se sembraron 5 µl de una dilución de 500 µg/ml (2,5 µg) de β_2 GPI o de protrombina humana y en el tercer círculo 5 µl de PBS-BSA 1 µg/ml (control de unión inespecífica). Luego se bloqueó la membrana durante 60 minutos con 5% de leche descremada en PBS pH 7,4 bajo agitación constante y se lavó tres veces con PBS-Tween 20 0,1%. Después de dejar secar las tiras de nitrocelulosa se incubó cada una con una dilución 1:50 de los diferentes sueros de pacientes en PBS-BSA 1%-Tween 20 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Como controles positivos se usaron los sueros controles de conejo anti- β_2 GPI o anti-protrombina humana diluido 1:200 en la misma solución diluyente de muestras. Luego de tres lavados con PBS-Tween 20 0,1%, se añadió una dilución 1:100 (realizada en el mismo diluyente) del antisuero de conejo anti-IgG humana marcado con peroxidasa (Sigma) en las tiras que habían sido incubadas con los sueros de los pacientes. Para las tiras incubadas con los sueros controles positivos se utilizó antisuero anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma) en una dilución 1:100 en el mismo diluyente. Esta etapa de incubación con el antisuero marcado se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 60 minutos. Todas las etapas de incubación se realizaron bajo agitación constante. Finalmente se lavaron las tiras con PBS-Tween 20 0,1% 5 veces y se procedió al desarrollo del color con el sustrato 4-cloro-1-naftol (Sigma) y H₂O₂ en metanol-PBS. Cuando las manchas se visualizaron se lavó la membrana con agua y se conservó en un recipiente con PBS.

Estudios de inhibición

Con proteínas

Para estos ensayos se seleccionaron seis sueros de pacientes que tenían una alta actividad de unión a β_2 GPI (3 sueros) o a protrombina (3 sueros) de isotipo IgG en ELISA. El efecto de la β_2 GPI o de la protrombina en fase fluida sobre la unión de

los anticuerpos en los ELISAs para anti- β_2 GPI o para anti-II fue evaluado diluyendo las muestras de suero 1:100 en el buffer diluyente conteniendo cantidades crecientes, de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$, de β_2 GPI o protrombina purificada.

Con anticuerpos monoclonales o policlonales antiproteínas

Otro experimento de inhibición fue realizado usando el anticuerpo monoclonal anti- β_2 GPI 5F7 (provisto por el Dr. J. Miller, Organon-Teknika, Rockville, USA). El efecto del mismo en el ELISA para anti- β_2 GPI fue evaluado a través de la preincubación de los pocillos con β_2 GPI con 50 μl de diluciones del anticuerpo monoclonal (de 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos. Luego de este período se añadieron 50 μl de la dilución de los sueros positivos ensayados y se incubaron durante los 105 minutos adicionales. En otro ensayo similar se utilizó el antisuero de conejo anti- β_2 GPI humana en diluciones crecientes de 1:2000 a 1:32000. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión a β_2 GPI en el ELISA.

Para los ensayos de inhibición en el ELISA para anti-II, los pocillos con protrombina se preincubaron durante 10 minutos con 50 μl de diluciones crecientes (1:2000 a 1:32000) del antisuero de conejo anti-II humana. Posteriormente se añadieron 50 μl de la dilución de los sueros positivos evaluados y se incubaron durante el período adicional de 50 minutos. Las etapas siguientes del ensayo se realizaron como se describió anteriormente. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión a protrombina en el ELISA.

Dosaje de β_2 GPI

La concentración sérica de β_2 GPI fue determinada en 158 pacientes con aFL usando un inmunoensayo con micropartículas de látex (Liatest β_2 GPI, Diagnostica Stago, Asnières, France). El método está basado en la utilización de una suspensión de micropartículas de látex que poseen en su superficie anticuerpos anti- β_2 GPI unidos en forma covalente. Estas partículas no absorben luz cuando ésta es de una longitud de onda mayor que el diámetro de las micropartículas. Sin embargo en presencia del antígeno las partículas se aglutinan y forman agregados de un diámetro mayor que absorben la luz. La absorbancia a 540 nm fue medida en el MS2 Titertek Plus Microplate Reader. La DO es directamente proporcional a la concentración de

antígeno. La curva de calibración fue realizada usando un pool de 20 sueros normales al cual se le asignó el valor medio normal de 250 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se expresaron en μg de $\beta_2\text{GPI}$ por ml de suero.

Purificación de la fracción IgG

La fracción IgG del suero fue obtenida utilizando el método de cromatografía de afinidad. Para ello se preparó una columna de proteína A insolubilizada en sefarosa CL-4B (Sigma) bajo condiciones de baja concentración de sales. De cada muestra se utilizaron 7 ml de suero cuyo pH fue ajustado a 8,0 a través del agregado de 0,7 ml de Tris 1M pH 8,0. Luego de lavar la columna con solución de NaCl 0,15M filtrada a través de filtros de 0,22 μm de diámetro (Millipore), se sembró el suero y luego se realizaron dos etapas de lavado. La primera con Tris 100mM pH 8,0 y la segunda con Tris 10mM pH 8,0. Posteriormente se eluyó la columna con glicina 100mM pH 3,0 y los eluidos fueron recolectados en fracciones de 2 ml en tubos conteniendo 200 μl de Tris 1M pH 8,0 para neutralizar el pH de los mismos. Los tubos que contenían inmunoglobulinas fueron identificados por presentar alta absorbancia a 280 nm medida en el UV-160A, UV Visible Recording Spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Los eluidos conteniendo inmunoglobulinas fueron colocados en bolsitas para diálisis de membrana de celulosa (Sigma) y se realizó la diálisis durante 24 horas a 4°C contra buffer Tris 0,02M-NaCl 0,15M pH 7,5. Estos eluidos fueron concentrados y redializados en el mismo buffer. Las concentraciones de proteínas se midieron utilizando el método colorimétrico de Bradford.²²⁴ Para ello se prepararon diluciones de los eluidos 1:50 y 1:100 en PBS y una curva con BSA (10 a 100 $\mu\text{g/ml}$). Se añadió 1 ml de colorante de Bradford (Coomassie brilliant blue G250-etanol-ácido fosfórico) en los tubos conteniendo 100 μl de muestra y luego de una incubación de 15 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm en el CL-770 Clinical Spectrophotometer (Shimadzu). Las concentraciones de los eluidos fueron obtenidos por interpolación en la curva realizada con BSA.

Las fracciones IgG fueron separadas de los sueros de 23 pacientes con aFL, 2 pacientes con sífilis y 2 pools normales.

Purificación de aCL por cromatografía de afinidad

Se utilizó el método de Pengo y col.²²⁵ que usa cardiolipina pura inmovilizada por interacciones hidrofóbicas con los grupos octil sobre partículas de octil-sefarosa. Esta metodología se usó para separar las inmunoglobulinas de tres pacientes con aFL.

Preparación de la columna

En un tubo de vidrio se añadieron 3 ml de cardiolipina bovina en etanol puro (Sigma), que corresponden a 15 mg de CL, y 6 ml de la suspensión de Octyl-Sepharose CL-4B en 24% de etanol (Sigma). El tubo se colocó en un agitador vertical y se realizó una incubación de 1 hora en la oscuridad bajo rotación lenta. Luego se procedió a diluir la suspensión con PBS en cuatro etapas sucesivas, realizando una incubación de 1 hora en rotación después de cada etapa de dilución. De esta manera la concentración de etanol en las distintas etapas fue disminuyendo de 45%, 30%, 5% a 1%. Posteriormente se aplicó la suspensión final (444 ml) en una columna de vidrio con capacidad para 10 ml y luego del empaquetamiento de la columna, se la lavó con NaCl 0,15M.

Purificación de aFL

Para evitar la unión no específica se bloqueó la columna con NaCl 0,15M-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se equilibró con NaCl 0,15M. Se aplicaron 10ml de suero en la columna y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La columna fue lavada con NaCl 0,15M a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto hasta que la DO_{280} del eluido fue menor de 0,050 U. En la siguiente etapa se eluyó el material unido a la CL-octil-sefarosa por medio de una solución de NaCl 1M. Las fracciones con proteínas identificadas por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu), fueron mezcladas y dializadas contra buffer Tris 0,02M-NaCl 0,15M pH 7,5 durante 24 horas y a 4°C.

Purificación de la fracción IgG

Se realizó sobre los eluidos obtenidos de la columna de cardiopina-octil-sefarosa por medio de la cromatografía de afinidad a columna de proteína A-sefarosa como se describió anteriormente.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Fue utilizada para evaluar la pureza de las preparaciones de IgG obtenidas por los métodos de cromatografía de afinidad. Se realizó por el método descrito por Laemmli²²⁶ usando geles de poliacrilamida al 7,5% (separating gel) y al 4% (stacking gel). Las muestras de IgGs se diluyeron en buffer Tris-SDS-glicerol pH 6,8 a una concentración de 200 µg/ml y luego de un calentamiento a 100°C durante 3 minutos se sembraron 5 µl de cada una de ellas. Además se sembró 5 µl del estándar de amplio rango de peso molecular (6,5 a 200 kD) para SDS-PAGE. La electroforesis bajo condiciones de no reducción se realizó a un voltaje constante de 200 voltios durante 45 minutos en el equipo Mini-Protean II Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Luego el gel fue coloreado con solución de Coomassie Brilliant Blue R250 al 0,1%, decolorado y deshidratado en solución de ácido acético-metanol-agua.

Western blotting

Este método se usó para probar la ausencia de β_2 GPI como contaminante en las preparaciones de IgG. El ensayo está basado en el método de Towbin y col.²²⁷ En una primera etapa se sembraron 25 µl de las muestras diluidas en buffer Tris-SDS-sacarosa pH 6,8 y calentadas a 100°C durante 3 minutos. El SDS-PAGE se realizó usando geles de poliacrilamida al 12% (separating gel) y al 4% (stacking gel). La electroforesis bajo condiciones de no reducción se realizó a un voltaje constante de 200 voltios durante 3 horas. La transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa se llevó a cabo usando un voltaje de 10 voltios durante 30 minutos y de 40 voltios durante 60 minutos. Luego del bloqueo de la membrana durante 30 minutos con 5% de leche descremada en PBS, se la lavó una vez con buffer Tris 10mM-NaCl 150mM pH 7,4 y tres veces con buffer borato pH 7,2 (ácido bórico 20mM-NaCl 150mM-Tween 20 0,1%-BSA 1%). Posteriormente se la incubó durante

toda la noche a 4°C con una solución del antisuero policlonal de conejo anti- β_2 GPI humana diluido 1:200 en PBS. Se procedió a lavar 5 veces con buffer Tris y a incubar la membrana durante 3-4 horas con una dilución 1:100 del antisuero anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma) en buffer Tris. Después de otros 5 lavados con buffer Tris, se realizó el revelado de la enzima con el sustrato 4-cloro-1-naftol (Sigma) y H₂O₂ en metanol-PBS. Cuando las bandas fueron visualizadas la membrana fue lavada con agua y conservada en PBS.

Ensayos en fase sólida con IgGs purificadas

Unión a CL, CL- β_2 GPI o β_2 GPI

Estos experimentos iniciales se llevaron a cabo utilizando las IgGs purificadas de 2 pacientes con sífilis, 10 pacientes con SAF y 1 pool normal. Además se ensayaron las tres IgGs purificadas por afinidad a columnas de cardiolipina-octil-sefarosa. Los ELISAs fueron realizados en placas Nunc estándar e irradiadas a 100 kGy. Para las comparaciones de la unión a CL, CL+ β_2 GPI o β_2 GPI, se realizó el pegado de los antígenos luego de dividir la placa en tres zonas de igual tamaño. En las zonas correspondientes a CL y (CL+ β_2 GPI) se agregaron 30 μ l/pocillo de solución de cardiolipina en etanol (50 μ g/ml) y se dejó evaporar durante toda la noche a 4°C. Después se añadieron 50 μ l/pocillo de una solución de β_2 GPI 40 μ g/ml en PBS en las zonas correspondientes a (CL+ β_2 GPI) y β_2 GPI y se incubó durante toda la noche a 4°C. Las preparaciones de IgGs fueron utilizadas a una concentración de 100 μ g/ml y aquellas provenientes de los aCL purificados por columna de CL-octil-sefarosa a una concentración de 10 μ g/ml. La solución de bloqueo y dilución de muestras y conjugados era PBS-BSA 1%. Las muestras fueron aplicadas por duplicado en los pocillos con antígeno y también en aquellos sin antígeno para descontar la unión no específica. Las etapas de bloqueo y de incubación de las IgGs tuvieron una duración de 1 hora cada una. Para el lavado de las placas se utilizó PBS y como conjugado antisuero de cabra anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina (Sigma). La reacción de color se realizó como en el ELISA estándar para aCL. La actividad neta de unión de las IgGs fue calculada como la diferencia entre las DO de las muestras y la del pool normal.

Unión a CL, β_2 GPI o protrombina

Estos estudios se realizaron con las IgGs de 23 pacientes con aFL y 2 pools normales. La unión a CL o β_2 GPI fue evaluada en placas Nunc irradiadas como se mencionó anteriormente y la unión a protrombina en placas Nunc estándar. El procedimiento se llevó a cabo en forma similar a lo explicado previamente. También en este caso la actividad neta de unión de las IgGs fue calculada como la diferencia entre las DO de las muestras y las de los pools normales.

Adsorción de IgGs purificadas con liposomas de cardiolipina

Para preparar los liposomas se colocaron 120 μ l de solución de cardiolipina bovina pura (5 mg/ml) en etanol (Sigma) en tubos eppendorf y se evaporó hasta sequedad bajo nitrógeno. Se agregaron 500 μ l de PBS o de solución de β_2 GPI humana 400 μ g/ml en PBS y se procedió a resuspender la CL por agitación en un vórtex durante 3 minutos. Luego 500 μ l de cada preparación de IgG (100 μ g/ml) fueron añadidos a los tubos conteniendo 500 μ l de liposomas de CL, liposomas de CL- β_2 GPI, solución de β_2 GPI 400 μ g/ml en PBS o solo PBS (control). Las concentraciones finales de los distintos componentes en la mezcla de reacción fueron: 50 μ g/ml de IgG, 600 μ g/ml de CL y 200 μ g/ml de β_2 GPI. Las mezclas de reacción se agitaron en vórtex durante 1 minuto y luego de una incubación de 60 minutos a 37°C se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 15 minutos. Los sobrenadantes conteniendo las IgG residuales fueron conservados a -20°C. Las actividades de unión de las IgG residuales en ELISA fueron evaluadas como se describió anteriormente. Estos ensayos de inhibición se realizaron con las IgGs purificadas de dos pacientes con SAF, 1 con sífilis y 1 pool normal. Los resultados de los experimentos de adsorción se expresaron usando la siguiente fórmula:

$$[(DO_{\text{IgG con PBS}} - DO_{\text{IgG con inhibidor}}) / DO_{\text{IgG con PBS}}] \times 100\%$$

Inhibidor= CL, CL + β_2 GPI o β_2 GPI

Evaluación de la actividad anticoagulante de las IgGs purificadas

La demostración de que las IgGs purificadas poseían actividad anticoagulante se realizó estudiando la prolongación de los ensayos de coagulación. Para ello se preparó un pool de 20 plasmas normales al que se le agregaron las preparaciones de IgGs purificadas (2 mg/ml en buffer Tris 0,02M-NaCl 0,15M pH 7,4) en una relación 1:1. Estas mezclas fueron estudiadas mediante el APTT con el reactivo PTT-LA (Stago), el dRVVT y el dPT con la tromboplastina recombinante diluida 1:500. La prolongación de las pruebas inducida por las IgGs purificadas de los pacientes con aFL se comparó con aquella provocada por la fracción IgG de controles normales. Como control se utilizó el pool de plasmas normales diluido 1:1 con buffer.

Dosaje de trombomodulina soluble plasmática

Fue realizado usando un ELISA (Asserachrom Thrombomodulin, Diagnostica Stago) en los plasmas de 65 pacientes con aFL, 14 pacientes con LES sin aFL (grupo control de LES) y 21 sujetos sanos. Todos los pacientes y controles seleccionados tenían niveles normales de creatinina plasmática. El kit provee la placa que tiene pegada en sus pocillos fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TM. Luego de preparar las diluciones 1:5 o 1:10 de las muestras en el correspondiente buffer de dilución (Tris-fosfato-BSA-Tween 20) se añaden 200 µl/pocillo y se incuba 2 horas a temperatura ambiente. Luego de 5 lavados se agregan 200 µl/pocillo de la solución del inmunocombinado (anticuerpo de ratón anti-TM marcado con peroxidasa) y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. El primer y el segundo anticuerpo anti-TM reconocen diferentes determinantes antigénicos sobre la molécula de TM. Se lava la placa nuevamente y se procede a desarrollar el color de la reacción después de agregar 200 µl/pocillo de una solución de o-fenilendiamina/H₂O₂. Luego de una incubación de 10 minutos se detiene la reacción añadiendo 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 3M. Las absorbancias fueron leídas a 492 nm y la concentración de TM (ng/ml) de cada plasma fue calculada por interpolación de la DO en una curva de calibración preparada con una solución de trombomodulina de referencia.

Dosaje de los niveles plasmáticos del activador tisular del plasminógeno

La concentración de t-PA fue medida en los plasmas de 49 pacientes con aFL, 14 pacientes con LES sin aFL y 17 personas normales mediante un ensayo de ELISA (Imubind t-PA, American Diagnostics Inc, USA). En la primera etapa se hizo el pegado del primer anticuerpo a la placa añadiendo 200 µl/pocillo de la solución del anticuerpo de cabra anti-tPA humano (reactivo A) y se incubó durante 16-18 horas a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa 4 veces con buffer PBS-EDTA-Tween y se añadieron 150 µl del reactivo A en los pocillos de la mitad de la placa y otros 150 µl de una solución de inmunoglobulina normal de cabra (reactivo N) en los pocillos de la mitad restante de la placa. Sin lavar la placa se agregaron 10 µl de cada muestra de plasma en los pocillos que contenían reactivo A y en aquellos con reactivo N. Se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas bajo agitación suave de la placa y luego se agregaron 50 µl/pocillo de la solución del conjugado (IgG de cabra anti-tPA humano marcada con peroxidasa). Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente bajo agitación suave de la placa se procedió al lavado de la misma. Se añadieron 200 µl/pocillo del sustrato (o-fenilendiamina/H₂O₂) y se incubó la placa en la oscuridad durante 30 minutos. Luego de frenar la reacción con 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 4,5M se leyeron las absorbancias a 492 nm. Para obtener la concentración de t-PA plasmático (ng/ml) la DO neta de cada muestra, que se calcula como la diferencia entre la DO del pocillo con reactivo N y la DO del pocillo con reactivo A, se interpoló en una curva de calibración.

Determinación de la resistencia a la proteína C activada

En los plasma de los pacientes

Para ello se utilizó el ensayo basado en el APTT (Coatest, Chromogenix, Mölndal, Sweden). El método para APC-R es un APTT modificado en el cual se evalúa la respuesta anticoagulante a la APC y se compara con los tiempos obtenidos en ausencia de APC. El ensayo fue realizado en un grupo de 74 pacientes con aFL y en 22 controles sanos. Los plasmas fueron diluidos 1:5 en plasma deficiente en factor V (Chromogenix) y los APTT se midieron usando el coagulómetro de detección fotoóptica Electra MLA 900C (Medical Laboratory Automation, Pleasantville, NY,

USA). Los resultados fueron expresados como un cociente entre el tiempo de coagulación obtenido en presencia de APC-Cl₂Ca y aquél obtenido con Cl₂Ca.

En plasma normal con las IgGs purificadas de los pacientes

Se preparó un pool de 20 plasmas normales y luego mezclas 1:1 de ese pool normal y de 24 (22 de pacientes con aFL y 2 de pools normales) IgGs purificadas por cromatografía en columna de proteína A-sefarosa. Las preparaciones de IgGs se llevaron a una concentración de 2 g/l en buffer Tris 0,02M-NaCl 0,15M pH 7,4. El ensayo de APC-R se realizó en forma similar al método mencionado anteriormente pero con la modificación de utilizar el reactivo de APTT diluido 1:1 en NaCl 0,15M para aumentar la sensibilidad del ensayo. Como control se utilizó el pool de plasmas normales diluido 1:1 con el buffer.

Extracción de los metabolitos urinarios del TXA₂

Las muestras de orinas se centrifugaron a 2000g por 10 minutos y el sobrenadante (10 ml) se utilizó para la extracción en fase reversa en columnas de octadecil (C₁₈) (JT Baker Inc, Phillipsburg, NJ, USA). Las columnas fueron prelavadas con 5 ml de metanol y 5 ml de agua. Las muestras se diluyeron con 5 ml de agua que contenía ³H-TXB₂ 14000 dpm (New England Nuclear/Du Pont, París, France, 3,7-9,25 TBq/mmol) y se acidificaron con ácido acético antes de ser aplicadas sobre las columnas. El trazador radioactivo fue usado para estimar la recuperación al final de las etapas de purificación. Las orinas se aplicaron sobre las columnas y luego éstas se lavaron con 5 ml de agua y 5 ml de acetonitrilo/agua (15:85, vol./vol.). Posteriormente se aplicó vacío a través de las columnas para secarlas y se lavaron con 5 ml de isooctano. Los metabolitos fueron eluidos de las columnas mediante la aplicación de 6 ml de isooctano/etil acetato (1:1, vol./vol.). Los eluidos fueron purificados en el mismo día o se congelaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Purificación de los metabolitos urinarios del TXA₂

Por extracción en fase sólida

Los eluidos obtenidos del pasaje de las orinas por las columnas de C₁₈ fueron purificados por una extracción en fase normal utilizando columnas de silica gel (SiOH) (JT Baker). Las columnas fueron lavadas con 5 ml de isooctano/etil acetato (1:1, vol./vol.), las muestras fueron pasadas y recogidas en tubos plásticos sobre los que también se recolectó el solvente eluido luego de lavar las columnas con 5 ml de etil acetato. Posteriormente se procedió a evaporar a sequedad los eluidos utilizando el concentrador Speedvac (Savant Instruments, NY, USA). Los extractos secos obtenidos se redisolviéron con 1 ml de buffer EIA (PBS 0,1M-NaCl 0,4M-EDTA 1mM-BSA 0,1%-azida sódica 0,01% pH 7,4) y se contó la radioactividad del ³H-TXB₂ usando un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments Inc, USA) para calcular la recuperación de estos metabolitos en el proceso.

Por cromatografía en capa fina

Luego de la extracción en columnas de C₁₈, los eluidos se evaporaron a sequedad con el Speedvac (Savant Instruments) y se redisolviéron en 70 µl de metanol/cloroformo (1:2, vol./vol.). Se purificaron posteriormente por cromatografía en capa fina por el método descrito por Lellouche y col.²²⁸ Las placas de sílice se lavaron por capilaridad con cloroformo/metanol (1:1, vol./vol.) durante 2 horas y se dejaron secar. Se activaron por calentamiento durante 1 hora a 110°C y se sembró el volumen total de las muestras. En el centro de la placa se sembraron los estándares de eicosanoides (TXB₂, 2,3-dinor-TXB₂, 11-dehidro-TXB₂, 2,3-dinor-6-ceto-PGF_{1α}, 6-ceto-PGF_{1α}) en diferentes posiciones. Luego se realizó la cromatografía durante 2-3 horas usando cloroformo/metanol/ácido acético/agua (90:8:1:0,8, vol./vol.) como solvente. Posteriormente se visualizaron los estándares usando un spray de clorodifluoroetano/clorodifluorometano (Sigma) para identificar las zonas de migración de los diferentes metabolitos. Para cada muestra se cortó y raspó la zona correspondiente al 11-dehidro-TXB₂/TXB₂ y se recolectó la silica en tubos de plástico sobre los que se agregaron 1 ml de buffer EIA. Luego de agitar con un vórtex y sonicar las muestras, se centrifugaron y realizó el conteo de la radioactividad del ³H-TXB₂ en el sobrenadante.

Dosaje del 11-dehidro-tromboxano B₂ urinario

Fue utilizado un procedimiento de EIA previamente reportado²²⁹ basado en un ensayo por competición que usa como marcador la enzima acetilcolinesterasa obtenida del *Electrophorus electricus* acoplada covalentemente al 11-dehidro-TXB₂ (trazador). Las diluciones en buffer EIA de las muestras (metabolitos purificados por los dos métodos descritos) y los estándares fueron añadidos (50 µl) en los pocillos de las placas Nunc que tenían pegado el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de conejo (2 µg/pocillo). Luego se añadieron 50 µl de las diluciones del trazador y del anticuerpo de conejo anti-11-dehidro-TXB₂. Las placas se incubaron a 4°C durante 14-18 horas y luego se lavaron con PBS 0,05M-Tween 20 0,05% pH 7,4. Posteriormente se agregaron 200 µl/pocillo del sustrato enzimático o reactivo de Ellman (acetiltiocolina 7,5x10⁻⁴M, 5-5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico 5x10⁻⁴M, PBS 0,01M). Se incubó en oscuridad durante 2-3 horas bajo agitación constante y la absorbancia a 414 nm fue medida usando el Multiskan MC (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia). Los resultados se expresaron como B/Bo (%). B representa la DO del eicosanoide marcado en presencia del 11-DH-TXB₂ de la muestra y Bo representa la DO del eicosanoide marcado en ausencia del 11-DH-TXB₂. Se construyó la curva de calibración log-logit usando los estándares y se calcularon las concentraciones de cada muestra en ng/ml. Los resultados fueron corregidos considerando el grado de recuperación del ³H-TXB₂ y expresados como ng/mmol de creatinina urinaria.

Métodos estadísticos

Los resultados se expresaron en valores medios ± desviación estándar (DE) o medianas y rango entre los percentilos 25 y 75. Para los datos con distribución normal se utilizaron el test de Student y para las correlaciones el método de Pearson (r). Cuando se analizaron datos que no seguían una distribución normal se usaron métodos no paramétricos como el de Mann-Whitney para dos grupos o el ANOVA de Kruskal-Wallis para más de dos grupos. En este último caso las comparaciones posteriores se realizaron por el método de Dunn y para las correlaciones se utilizó el rango de Spearman (r_s). Para comparar los datos de proporciones se utilizaron la prueba de chi cuadrado con la corrección de Yate o el test de Fisher. Las estimaciones de riesgos se expresaron como odds ratios (OR) y su intervalo del 95% de confianza (IC 95%). Las variables que mostraron significación estadística en el análisis

univariado se estudiaron posteriormente por análisis multivariado. Para ello se utilizó el método de regresión logística escalonada (backward). En todos los casos se consideró la significación estadística cuando la probabilidad (p) era menor de 0,05.

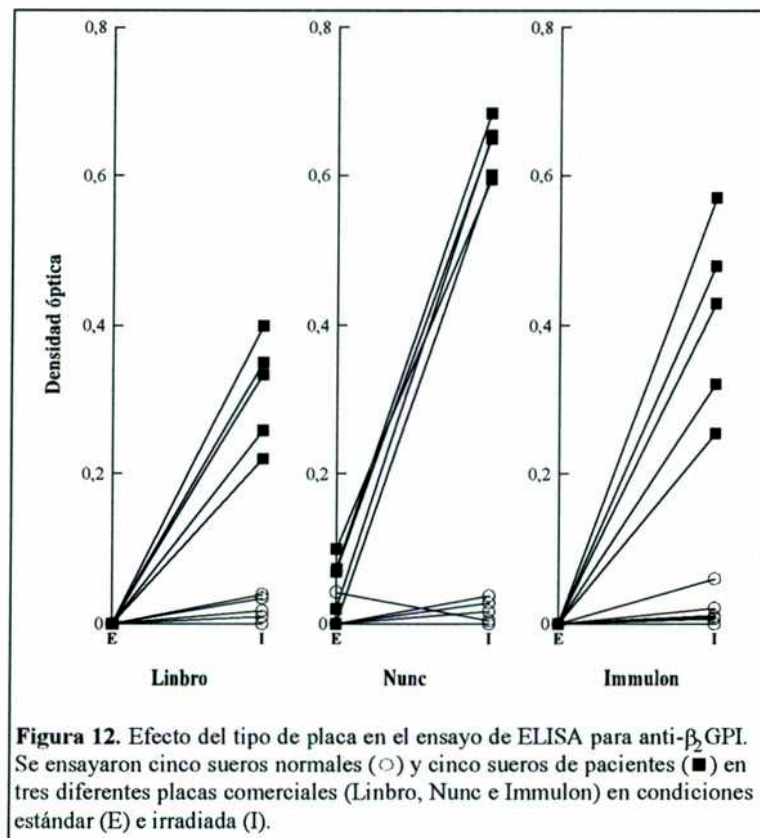
**RESULTADOS
Y
DISCUSION**

Parte 1: Inmunoensayo para anti- β_2 GPI y anti-II

Desarrollo del ELISA para anti- β_2 GPI

Elección del tipo de placa

Se probaron tres tipos de placas comerciales: Nunc-Maxisorp de Nunc-Denmark, Immulon 1 de Dynatech-USA y Linbro de Flow-USA. Para estas experiencias se eligió arbitrariamente la concentración de 1 $\mu\text{g/pocillo}$ de β_2 GPI. Se ensayaron 5 sueros normales y 5 con positividad fuerte en el ELISA de aCL-IgG. Los primeros ensayos con estas placas comerciales se caracterizaron por dar valores muy altos de DO en los pocillos sin antígeno (unión no específica), lo que no permitió una clara definición entre resultados positivos y negativos. Luego se realizó la irradiación de las placas con rayos de electrón a una dosis de 100 kGy, lo cual causa la oxidación de la superficie de la placa por la unión covalente de los átomos de oxígeno al poliestireno.²³⁰ De esta manera se pudo lograr una clara diferenciación entre los resultados de sueros normales y los de sueros positivos para aCL-IgG, por lo cual se decidió utilizar las placas Nunc irradiadas para la realización del ELISA (Figura 12).



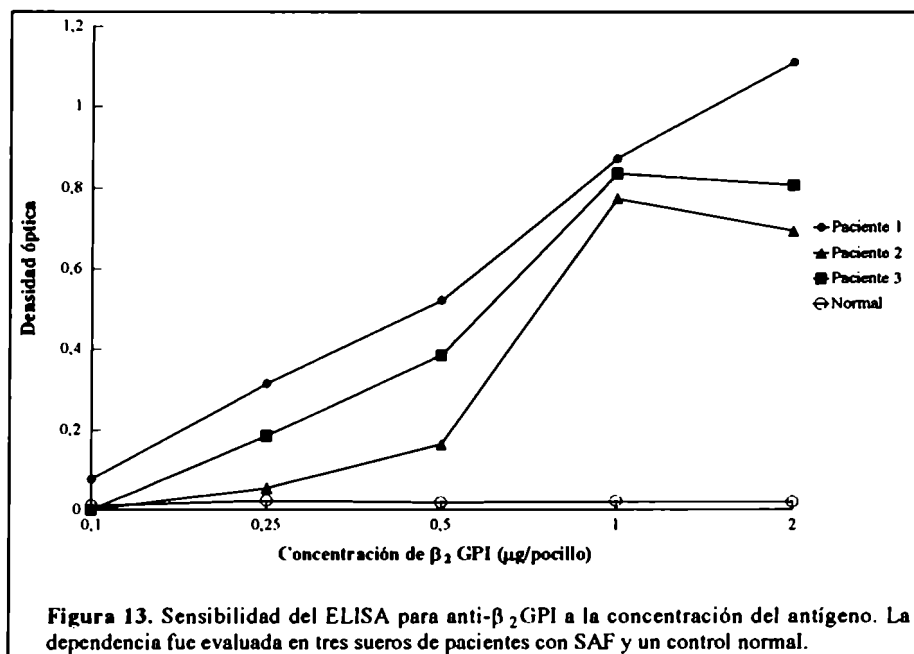
Es importante mencionar que el suero control de conejo anti- β_2 GPI humana mostró valores similares de DO en las placas Nunc estándar (1,050) e irradiada (1,230). Estas condiciones fueron estandarizadas en el ensayo para el isotipo IgG y luego se utilizaron para determinar también el isotipo IgM.

Soluciones

De las distintas soluciones utilizadas en el ensayo, se eligieron BSA al 10% en PBS como solución bloqueante, PBS-Tween 20 0,1% para las etapas de lavado y BSA al 1% en PBS-Tween 20 0,1% como solución diluyente de muestras y conjugados, por obtener con ellas mejor separación entre resultados positivos y negativos. Esto se debió principalmente a la disminución del pegado no específico y a la utilización de los fragmentos $F(ab')_2$ en lugar de la molécula entera de las inmunoglobulinas marcadas con peroxidasa como conjugados.

Concentración del antígeno y dilución de los sueros

Para determinar la concentración de β_2 GPI a utilizar en el ELISA, se usaron diferentes cantidades de la proteína en la etapa de pegado del antígeno y se midió la actividad de unión de tres sueros de pacientes con SAF y un suero control normal.



En estos experimentos los sueros se usaron diluidos 1:100. Como se observa en la Figura 13, la unión depende de la concentración de β_2 GPI aplicada al pocillo y se encontró que la cantidad mínima necesaria para obtener la máxima actividad de unión fue de 1 μ g. En nuestro ensayo usamos una concentración final de 2 μ g/pocillo de β_2 GPI. Para realizar una comparación, se evaluó la dependencia en los mismos sueros diluidos 1:50 para el ELISA estándar de aCL-IgG (Tabla 10). La mejor diferenciación entre resultados positivos y negativos se obtuvo usando una concentración de CL mayor o igual de 0,75 μ g/pocillo. Estos datos concuerdan con la concentración de CL de 1,5 μ g/pocillo recomendada para este ensayo.²⁹

Tabla 10. Sensibilidad del ELISA para aCL-IgG a la concentración de cardioplipina usada en las placas. Evaluación en tres sueros positivos para aCL y un suero normal.

<i>Cardiolipina</i> μ g/pocillo	<i>Densidad óptica</i>			
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Control normal
0,35	0,536	0,395	0,354	0,022
0,75	0,802	1,108	1,200	0,060
1,50	1,190	1,364	1,166	0,075

Los anti- β_2 GPI y aCL (IgG) se evaluaron usando diluciones crecientes del suero de tres pacientes con SAF y en un control normal (Tabla 11). En estos experimentos se utilizaron placas cuyos pocillos contenían 2 μ g de β_2 GPI ó 1,5 μ g de CL, por ser las concentraciones óptimas de acuerdo a los resultados anteriores.

Tabla 11. Efecto de la dilución creciente de los sueros en los ELISAs.

Dilución	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Control normal
	<i>anti-β_2GPI (DO)</i>			
1:100	0,940	0,535	0,810	0,025
1:200	0,720	0,425	0,610	0,028
1:400	0,502	0,342	0,391	0,015
1:800	0,325	0,237	0,320	0,010
<i>aCL (DO)</i>				
1.50	1,280	1,467	1,150	0,055
1:100	0,905	1,076	0,950	0,049
1:200	0,579	0,615	0,670	0,060

Estos resultados indican una disminución de la unión a los antígenos usados en los ELISAs cuando se usaron diluciones crecientes de los sueros, lo cual es compatible con la reducción en la concentración de los anticuerpos en las muestras analizadas. La dilución de los sueros 1:50 o 1:100 para el ensayo de aCL es la recomendada para este ELISA.²⁹ Para la realización del ELISA de anti- β_2 GPI se eligió la dilución 1:100 porque permitía una mejor diferenciación entre los resultados y evitaba el inconveniente de la unión inespecífica con diluciones menores.

Especificidad del ELISA

La especificidad de la unión de los anticuerpos en el ELISA de anti- β_2 GPI se evaluó en experimentos de inhibición usando β_2 GPI soluble y con anticuerpos mono y policlonales anti- β_2 GPI humana.

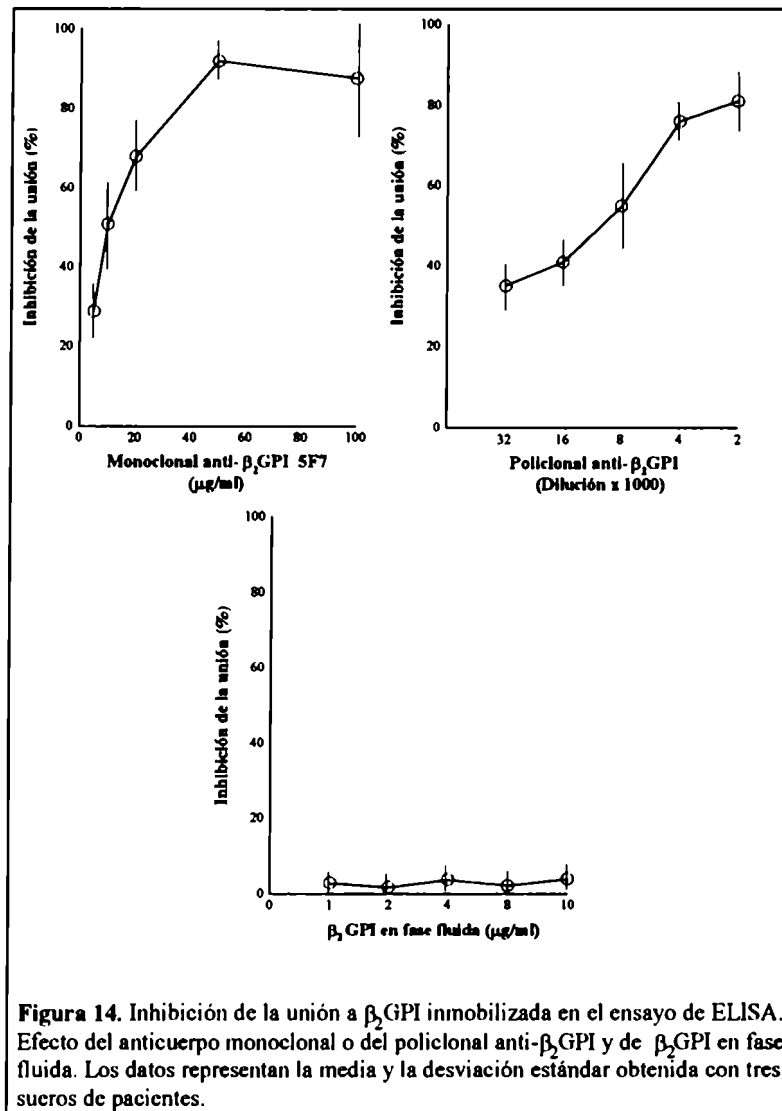


Figura 14. Inhibición de la unión a β_2 GPI inmobilizada en el ensayo de ELISA. Efecto del anticuerpo monoclonal o del policlonal anti- β_2 GPI y de β_2 GPI en fase fluida. Los datos representan la media y la desviación estándar obtenida con tres sueros de pacientes.

En el ensayo competitivo de preincubación con los anticuerpos mono o policlonales se observó un fuerte efecto inhibitorio en los tres sueros positivos que se evaluaron para anti- β_2 GPI. En la Figura 14 se muestra que el efecto fue dosis dependiente y la inhibición fue superior al 50% con concentraciones del antisuero monoclonal mayores de 10 $\mu\text{g/ml}$ y con diluciones del antisuero policlonal menores de 1:8000. Por el contrario, la β_2 GPI soluble (de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$) añadida a las diluciones de los sueros no fue capaz de inhibir la unión de los anti- β_2 GPI a la β_2 GPI pegada en los pocillos de las placas. Los experimentos de inhibición con liposomas de CL con o sin β_2 GPI se comentarán en la Parte 3 de Resultados.

Coefficientes de variación

La variación interensayo fue determinada usando 10 sueros con altos niveles de anti- β_2 GPI humana (5 para IgG y 5 para IgM), los cuales se procesaron en 10 oportunidades diferentes. Los coeficientes interensayo fueron 10% (IgG) y 13% (IgM). Los coeficientes intraensayos fueron menores de 5% (IgG) y 7% (IgM).

Valores de referencia para anti- β_2 GPI expresados en DO

Los valores normales fueron obtenidos procesando 80 sueros de personas sanas y los puntos de corte del ensayo se calcularon por el método de los percentilos y se establecieron en el percentilo 99.²³¹ Además, los niveles de los anticuerpos fueron arbitrariamente categorizados en grados de positividad de acuerdo al siguiente esquema: DO mayor al punto de corte y menor a la DO promedio normal + 5 DE (positivo débil), DO entre la DO promedio normal + 5 DE y + 10 DE (positivo moderado) y DO mayor que la DO promedio normal + 10 DE (positivo fuerte). Para los anti- β_2 GPI se obtuvieron los valores mostrados en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores de referencia para anti- β_2 GPI expresados en DO.

<i>Resultado</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>
Negativo	<0,055	<0,050
Positivo débil	0,055-0,150	0,050-0,150
Positivo moderado	0,150-0,300	0,150-0,300
Positivo fuerte	>0,300	>0,300

Desarrollo del ELISA para anti-II

Elección del tipo de placa

Considerando los resultados obtenidos previamente para el ELISA de anti- β_2 GPI, se testeó la influencia de la irradiación de las placas de poliestireno en la sensibilidad del ensayo. Se utilizaron placas Nunc en dos condiciones, irradiadas con una dosis de 100 kGy y estándar (comercial). La concentración de protrombina usada en estas experiencias fue de 1 μ g/pocillo. Las placas estándares son producidas comercialmente por radiación y para incrementar la capacidad de adsorción de las mismas. La dosis de radiación utilizada por las empresas es desconocida pero en general es menor de 30 kGy. Para estandarizar el ELISA de anti-II se seleccionó un grupo de 10 sueros de pacientes con fuerte actividad de AL. Se halló un resultado positivo para anti-II en 3 de estos 10 sueros. En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos para el isotipo IgG en los tres sueros de pacientes con AL y anti-II y en tres sueros normales.

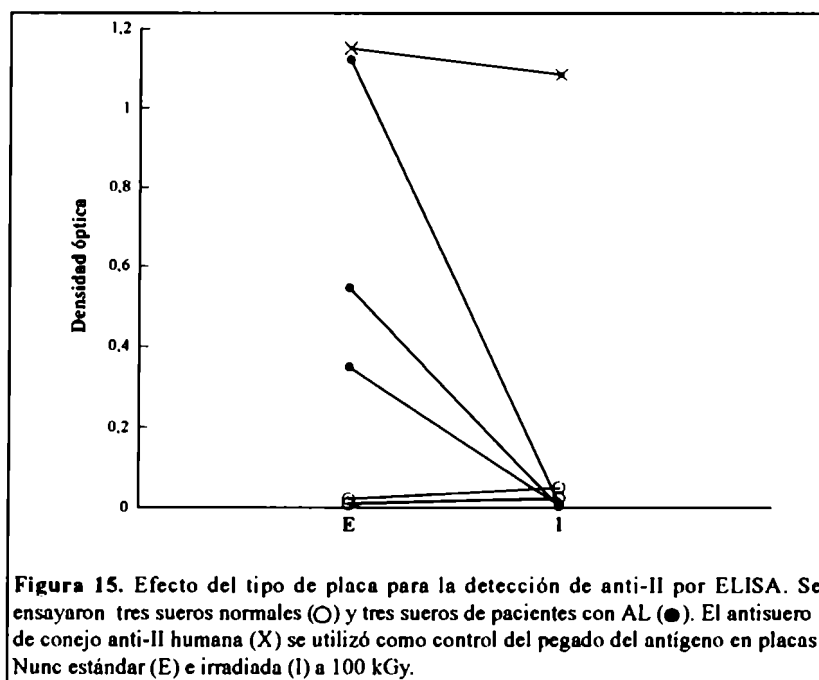


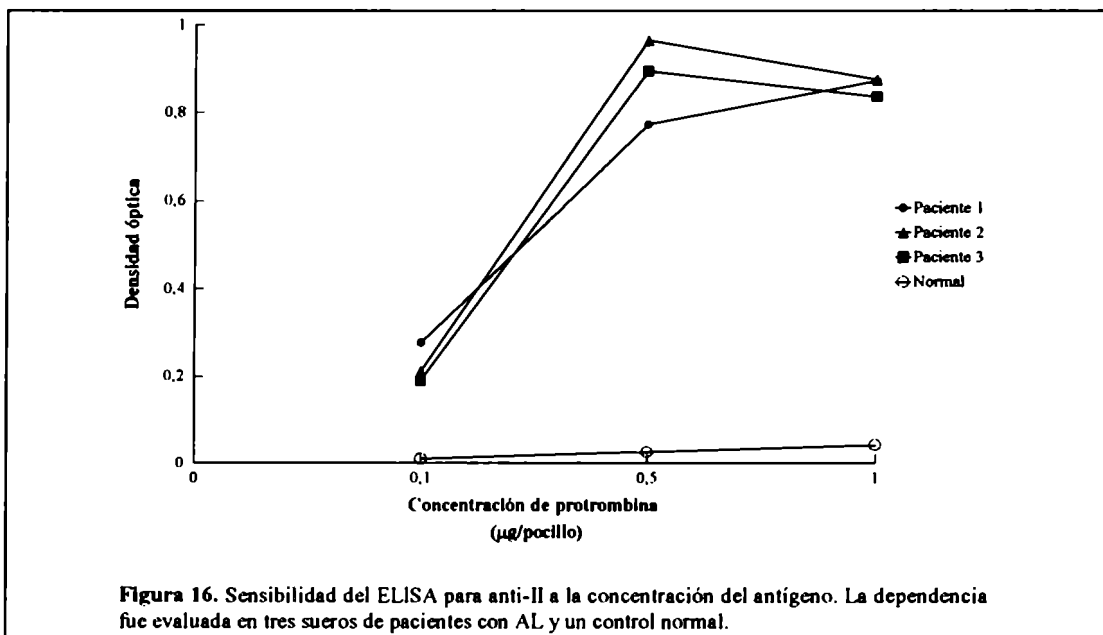
Figura 15. Efecto del tipo de placa para la detección de anti-II por ELISA. Se ensayaron tres sueros normales (O) y tres sueros de pacientes con AL (●). El antisero de conejo anti-II humana (X) se utilizó como control del pegado del antígeno en placas Nunc estándar (E) e irradiada (I) a 100 kGy.

Los sueros normales no mostraron capacidad de unirse a la protrombina inmovilizada en ningún tipo de placa. Por el contrario, se encontró que algunos de los sueros de pacientes con AL presentaban reactividad con la protrombina solamente cuando ésta se presentaba adsorbida sobre placas estándar. Se decidió utilizar las placas Nunc estándar para evaluar la población total de pacientes. El suero control de

conejo anti-II humana mostró valores de DO muy similares en ambos tipos de placas, lo cual sugiere que la proteína se pegaría en cantidades similares en placas estándar e irradiada.

Condiciones del ensayo

Al igual que en el ELISA para anti- β_2 GPI, luego de seleccionar la placa para el ensayo, se evaluó la concentración óptima del antígeno para la mejor detección de estos anticuerpos. Para ello se seleccionaron tres sueros de pacientes con AL y anti-II y un suero control normal. Se midió la actividad de unión de los mismos a la protrombina aplicada a la placa en diferentes concentraciones. Estas pruebas se realizaron evaluando el isotipo IgG.



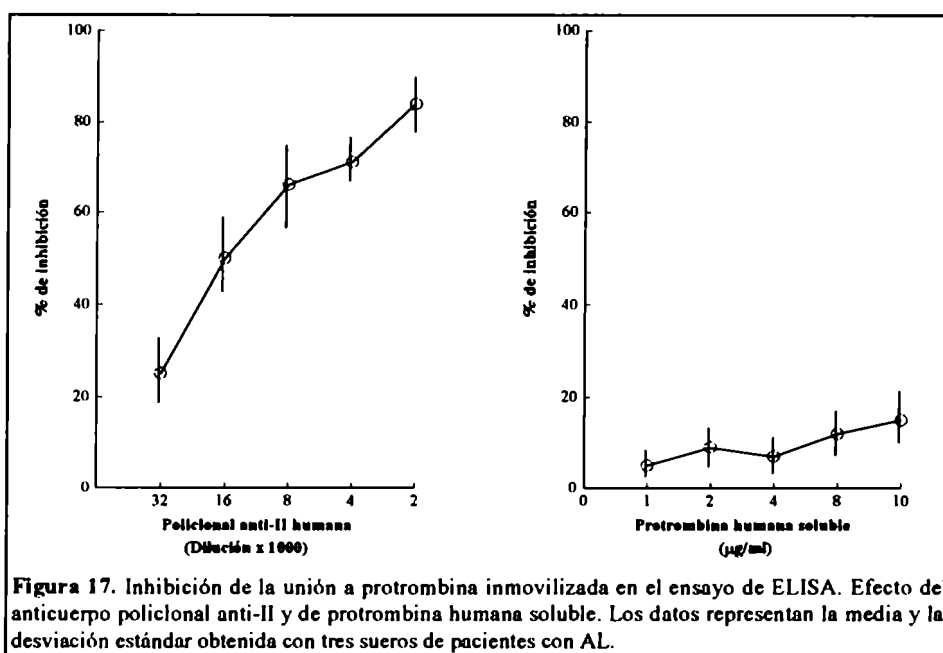
Como se observa en la Figura 16, la unión depende de la concentración del antígeno y se eligió la concentración de 0,5 μ g/pocillo de protrombina como la óptima para este ELISA. La dilución de los sueros 1:100 fue elegida considerando los resultados obtenidos previamente en el ELISA de anti- β_2 GPI y se prefirió no utilizar una dilución menor para evitar el problema del pegado no específico.

Otro de los temas considerados fue el tipo de soluciones utilizadas en el ELISA. Respecto a la solución utilizada para el pegado de la protrombina, los mejores resultados fueron observados usando PBS comparados con aquellos obtenidos con buffer carbonato pH 9,6 o Tris-NaCl pH 7,4. Para seleccionar la solución bloqueante,

se compararon BSA al 10% en PBS-Tween y la misma solución con el añadido de gelatina al 0,3%. Se prefirió usar la solución sin gelatina por permitir una mejor diferenciación de resultados positivos y negativos. Para la solución diluyente de muestras se realizó una comparación similar a esta última, pero usando BSA al 1%, y se arribó a la misma conclusión (elección de soluciones basadas en BSA sin gelatina). Cuando se evaluó el efecto de la presencia de iones calcio (CaCl_2 5mM en Tris-NaCl pH 7,4) en los distintos pasos del ensayo, no se obtuvieron cambios apreciables en los resultados en la presencia o ausencia de este ion en el buffer Tris-NaCl. Un punto muy importante fue el requerimiento del detergente Tween 20 en todas las soluciones, con la excepción de la utilizada en el pegado del antígeno, para la optimización del ELISA.

Estudios de inhibición

La especificidad de la unión de los anticuerpos con la protrombina humana fue examinada mediante inhibición con el antisuero policlonal de conejo anti-protrombina y con la proteína en solución. En estos ensayos la protrombina fue aplicada a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ y se evaluó el isotipo IgG.



La preincubación con el antisuero policlonal, antes del añadido de la dilución de los sueros positivos de los pacientes, resultó en un efecto inhibitorio (dosis dependiente) de la unión (Figura 17). La inhibición fue superior al 50% cuando se

usaron diluciones del policlonal menores de 1:16000. Por el contrario, la protrombina humana añadida a las diluciones de los mismos sueros no pudo inhibir la interacción de los anticuerpos con la proteína inmovilizada en la placa, al menos con concentraciones de hasta 10 µg/ml.

Coefficientes de variación

La variación interensayo fue determinada usando 10 sueros con altos niveles de anti-II humana (5 para IgG y 5 para IgM), los cuales se procesaron en 10 oportunidades diferentes. Los coeficientes interensayo fueron 10% para el isotipo IgG y 12% para el isotipo IgM. Los coeficientes intraensayos para ambos isotipos fueron siempre menores a 7%.

Valores de referencia para anti-II expresados en DO

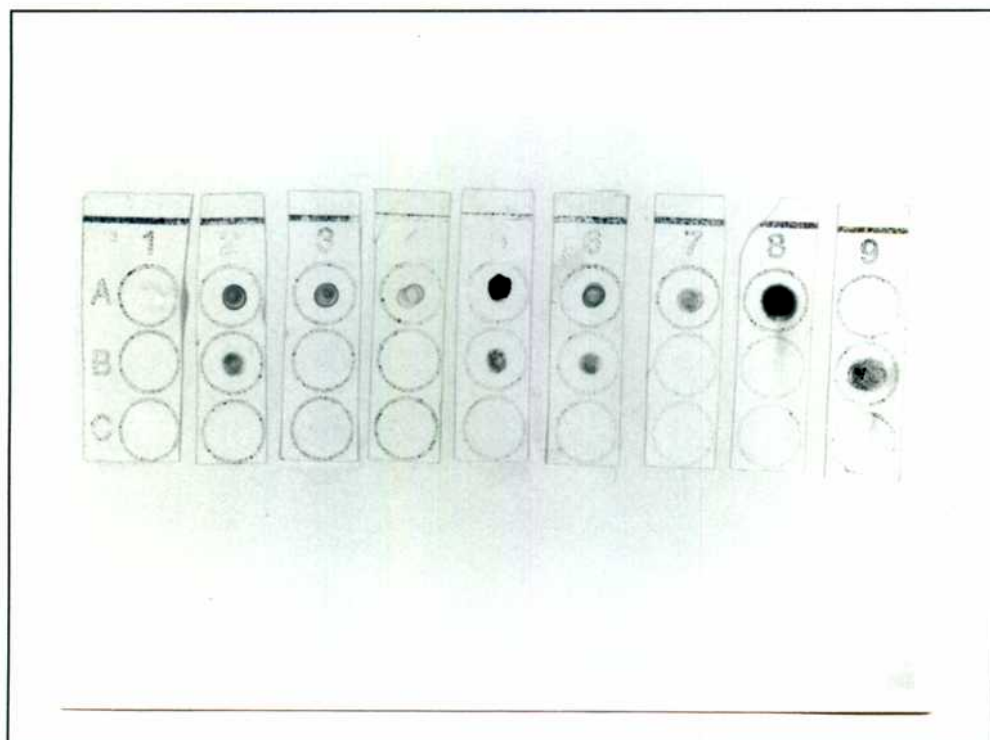
Los valores normales fueron obtenidos procesando 80 sueros de personas sanas y los puntos de corte del ensayo se calcularon por el método de los percentilos y se establecieron en el percentilo 99.²³¹ Los niveles de los anticuerpos fueron categorizados en grados de positividad de acuerdo al esquema mencionado anteriormente para los anti-β₂GPI.

Tabla 13. Valores de referencia para anti-II expresados en DO.

<i>Resultado</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>
Negativo	<0,067	<0,023
Positivo débil	0,067-0,150	0,023-0,150
Positivo moderado	0,150-0,300	0,150-0,300
Positivo fuerte	>0,300	>0,300

Detección de autoanticuerpos por dot blot

Utilizando seis sueros de pacientes con SAF que presentaban resultados positivos en los ELISAs de anti- β_2 GPI y/o anti-II, se decidió evaluar si estos anticuerpos podían ser detectados por medio de inmunoblotting. La Figura 18 muestra estos resultados.



<i>ELISA-IgG</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
anti- β_2 GPI (DO)	0	1,660	2,083	1,440	0,528	0,328	1,830	2,050	0
anti-II (DO)	0	1,200	0	0,314	0,410	1,123	0	0	1,850

Figura 18. *Parte superior:* Detección de autoanticuerpos por dot blotting. Las columnas indican los números de los diferentes sueros ensayados (1: normal, 2 a 7: pacientes con SAF, 8: control positivo anti- β_2 GPI, 9: control positivo anti-II). Las filas indican el antígeno utilizado. A: β_2 GPI humana, B: protrombina humana, C: albúmina bovina. *Parte inferior:* tabla de resultados de los mismos sueros ensayados por ELISA. Los datos se expresan en densidades ópticas.

Para los anti- β_2 GPI-IgG, se obtuvo una muy buena correlación entre los dos ensayos comparados. Sin embargo, los resultados para anti-II-IgG mostraron que en el paciente 4 los anticuerpos se detectaron por ELISA pero no por dot blot.

Discusión de los resultados de la Parte 1

Como se mencionó anteriormente, a comienzos de la década de los años 90 se sugirió que los aFL requerían un cofactor proteico para expresar su actividad. Más aún, un grupo de investigadores reportó que el cofactor proteico (β_2 GPI) era reconocido por los aCL en la ausencia de FL.⁶⁷ Estos hallazgos generaron una considerable controversia, en lo que respecta al verdadero antígeno de los aCL. Algunos grupos consideran que la β_2 GPI aumenta la capacidad de unión de los aFL a los FL, pero que su presencia no es imprescindible.^{89,94,95} Por el contrario, algunos trabajos pioneros demostraron que en los pacientes con aFL era posible detectar anticuerpos que reaccionaban con la β_2 GPI en ausencia de FL.^{232,233} Para los anticuerpos con actividad de AL, también se publicaron datos contradictorios en lo referente al requerimiento de β_2 GPI y protrombina como cofactores.^{61,64,96-98,234}

Uno de los primeros objetivos de este trabajo fue desarrollar inmunoensayos para detectar anticuerpos anti- β_2 GPI y anti-II. Se logró optimizar las condiciones para los dos ELISAs, lo cual era fundamental para la utilización posterior de los mismos en la evaluación de los pacientes. Una de las variables más importantes fue la elección del tipo de placa que permitiera la interacción entre los antígenos y los anticuerpos. En las primeras experiencias no se encontró evidencia de unión de los aCL a la β_2 GPI cuando ésta era ensayada en placas estándar, en coincidencia con los datos de otros autores. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos contra β_2 GPI pudieron ser detectados cuando se utilizó placas de poliestireno tratadas con radiación de electrones. Algunos autores han encontrado que el uso de placas de PVC también permite la identificación de estos anticuerpos.²³⁵ El requerimiento de una superficie especial para poder identificar *in vitro* a los anti- β_2 GPI permite explicar las divergencias observadas en los resultados de los diferentes estudios publicados. Se han sugerido dos posibles hipótesis para entender la interacción *in vitro* de los aCL con la β_2 GPI. Una de ellas, propuesta por Matsuura y col.,²³⁶ sugiere que los aCL que reaccionan con el complejo β_2 GPI y CL en el ensayo clásico de ELISA para aCL, reconocen un neoepitope generado en la molécula de β_2 GPI cuando ésta sufre un cambio conformacional al interactuar con una superficie polioxigenada. La hipótesis de Roubey y col.,²³⁷ sugiere que los anti- β_2 GPI son de baja afinidad y requieren una alta concentración antigénica en la placa para lograr la unión bivalente de los anticuerpos, efecto que se consigue al utilizar superficies con alta capacidad para adsorber proteínas. Parte de estas últimas conclusiones fueron el resultado de la observación de que los fragmentos F(ab) de los aCL tienen menor capacidad de unirse a la proteína que los fragmentos F(ab')₂. La detección de anti- β_2 GPI por medio de ensayos de dot o Western blot,^{238,239} sugieren

que esta interacción está más probablemente relacionada a un fenómeno de alta concentración antigénica.

En lo que respecta al ensayo de anti-II, los mejores resultados fueron obtenidos cuando se usaron placas comerciales estándar, las cuales son tratadas por la empresa fabricante con baja dosis de radiación. Por el contrario, los ensayos realizados con placas modificadas por la aplicación de altas dosis de radiación impiden que una correcta interacción proteína-anticuerpo pueda tener lugar. Esto sugiere que el factor más crítico en la estandarización de este ELISA es también la elección del tipo de placa, como sucede con el ELISA para anti- β_2 GPI. Por lo tanto, se han propuesto hipótesis similares a las mencionadas anteriormente para entender el concepto de la detección de estos anticuerpos solamente bajo ciertas condiciones experimentales.²⁴⁰ Sin embargo, todavía no hay pruebas concluyentes para avalar cualquiera de las hipótesis para los anti-II.

La especificidad de la unión proteína-anticuerpo en los ELISAs fue avalada por la ausencia de FL contaminantes en las preparaciones de las proteínas utilizadas como antígenos y por la utilización del detergente Tween 20 en los buffers, lo cual elimina la posibilidad de la presencia de FL en los ensayos. La especificidad de la interacción fue también demostrada por la capacidad de los anticuerpos mono y policlonales anti- β_2 GPI o anti-II de inhibir la unión de los aFL.

Algunos datos experimentales obtenidos en este trabajo sugieren que la modificación de las placas de poliestireno no estaría relacionada con una mayor concentración de antígeno. Esta conclusión surge de la observación de que los antisueros policlonales de conejo anti- β_2 GPI o anti-II humana presentan valores de DO muy similares cuando se usan placas tratadas o no con radiación. Esta conclusión coincide con los datos experimentales presentados por Koike y col.²⁴¹

Los resultados negativos en los estudios de inhibición con las proteínas en fase fluida indican que los aFL sólo pueden unirse a la β_2 GPI o protrombina cuando las proteínas han sido inmovilizadas y han modificado su estructura como resultado de la interacción con una superficie adecuada. La falta de inhibición con β_2 GPI soluble en altas concentraciones, como se muestra en la Parte 3 de Resultados, sugieren que estos anticuerpos no parecen ser de baja afinidad. Estos resultados son coincidentes con aquellos de Matsuura y col.,²³⁶ pero difieren de los datos de otros autores que encuentran un alto grado de inhibición con altas concentraciones de β_2 GPI soluble.^{233,237} Para los anti-II, se ha reportado que la protrombina en fase fluida compite muy poco con la proteína inmovilizada,²⁴⁰ provocando inhibición parcial de la unión en el ELISA.

La detección de estos anticuerpos por técnicas de inmunoblotting no está aún muy difundida en la literatura y existen datos contradictorios. Algunos autores encuentran reactividad de los aCL con la β_2 GPI por Western blot,^{238,239,242} pero otros no.⁶⁴ Los anti-II fueron también detectados por Western blot.⁶⁴ Los resultados de esta tesis indican que estos anticuerpos pueden ser identificados por ensayos de dot blot, como ha sido reportado especialmente para los anti- β_2 GPI.^{238,239} Debido a que la interacción que se evalúa por dot blot no depende de un cambio conformacional de la proteína, es posible que en algunos pacientes con aFL coexistan anticuerpos que reconocen neopitopes en estas proteínas con otro tipo de anticuerpos de baja afinidad capaces de reaccionar con las proteínas nativas.

Parte 2: Anti- β_2 GPI y anti-II en pacientes con aFL

Asociaciones de los anti- β_2 GPI y anti-II con los aCL y el AL

En la Tabla 14 se presentan los resultados de AL y de aCL en la población total (n=233) y en los diferentes grupos de pacientes con aFL. La actividad de AL no pudo ser determinada en 12 pacientes de la población estudiada. Los aCL en la población total fueron positivos en 195 casos, siendo IgG e IgM(+) en 91 pacientes, sólo IgG(+) en 63 y sólo IgM(+) en 41 pacientes. La presencia simultánea de AL y aCL se detectó en 119 de los 221 (53,8%) pacientes en quienes se pudo evaluar ambas actividades.

Tabla 14. Resultados de los estudios de aFL en la población evaluada.

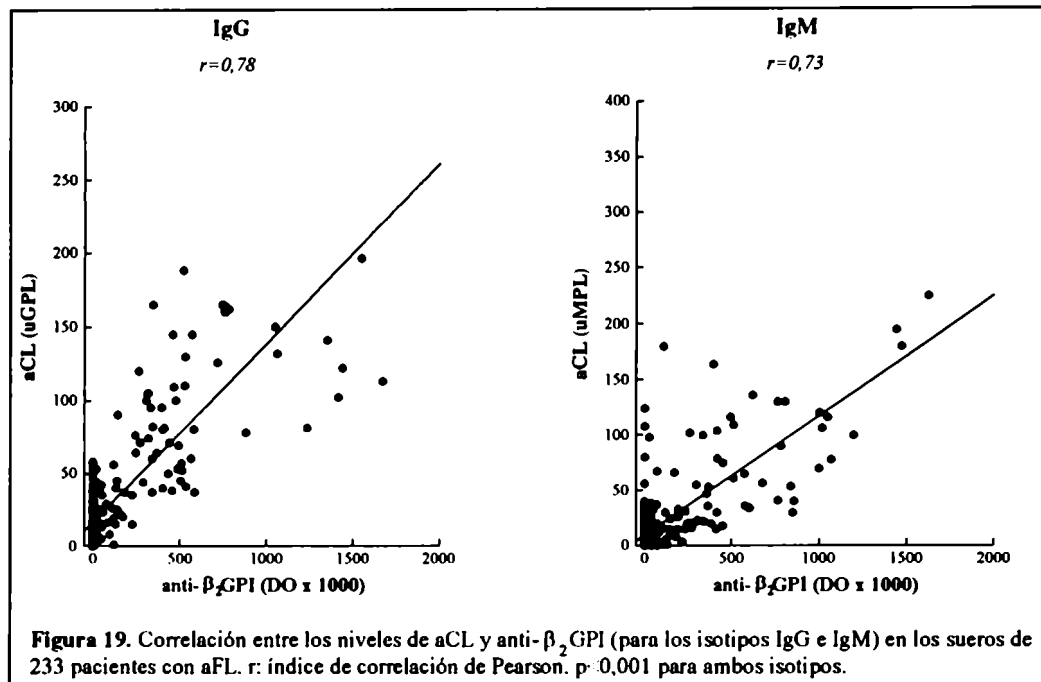
	<i>AL(+)</i>	<i>aCL(+)</i>	<i>aCL-IgG(+)</i>	<i>aCL-IgM(+)</i>
Población total	156	195	154	132
n=233	70,6%	83,6%	66,1%	56,6%
SAF primario	64	77	62	53
n=92	72,7%	83,7%	67,4%	57,6%
SAF secundario	19	26	22	20
n=28	73,1%	92,8%	78,6%	71,4%
LES sin SAF	25	45	37	28
n=49	52,1%	91,8%	75,5%	57,1%
Misceláneas	48	47	33	31
n=64	81,3%	73,4%	51,5%	48,4%

Prevalencia y correlaciones de los autoanticuerpos antiproteínas

En la población total con aFL, 112/233 (48,1%) pacientes eran anti- β_2 GPI(+). Los anti- β_2 GPI de isotipo IgG se encontraron positivos en 73 casos y los de isotipo IgM en 81. Los anti-II sólo pudieron evaluarse en 223 pacientes y fueron positivos en 58 de ellos (26,0%). En 43 casos eran de isotipo IgG y en 21 pacientes se encontró positivo el isotipo IgM.

Como se muestra en la Figura 19 para la población total, los niveles de los aCL presentaron una muy buena correlación con los de anti- β_2 GPI. El índice de correlación fue de 0,78 (IC 95%: 0,72-0,83) para el isotipo IgG y 0,73 (IC 95%:

0,67-0,79) para el isotipo IgM. Por el contrario, los títulos de aCL se correlacionaron pobremente con los niveles de anti-II ($r=0,39$ para IgG y $r=0,21$ para IgM). Las correlaciones entre los niveles de anti- β_2 GPI y los de anti-II fueron también muy pobres ($r=0,27$ para IgG y $r=0,31$ para IgM).



Cuando sólo se consideraron los sueros con resultados positivos para aCL ($n=195$), se encontró también una muy importante correlación con los anti- β_2 GPI ($p < 0,001$). Los índices de correlación fueron 0,74 (IC 95%: 0,66-0,81) para IgG y 0,68 (IC 95%: 0,58-0,77) para IgM. Considerando este grupo aCL(+), la prevalencia de anti- β_2 GPI(+) aumentó a 57,4% (112/195). Es importante remarcar que ninguno de los 37 pacientes AL(+)aCL(-) presentó resultados positivos en el ELISA para anti- β_2 GPI. Sin embargo, en 5 de estos casos se encontró reactividad en el ensayo de anti-II.

Niveles de aCL, anti- β_2 GPI y anti-II en pacientes con o sin actividad de AL

La Tabla 15 muestra los niveles de los distintos anticuerpos y la comparación de los mismos en los pacientes agrupados como AL positivos o negativos. Los pacientes AL(+) tienen mayores niveles medios de los tres tipos de anticuerpos

medidos por ELISA para el isotipo IgG. La significación estadística se indica en la tabla.

Tabla 15. Niveles de aCL (unidades), anti- β_2 GPI (DO x 1000) y anti-II (DO x 1000) en 156 pacientes AL(+) y 65 pacientes AL(-).

	<i>aCL</i>		<i>anti-β_2GPI</i>		<i>anti-II</i>	
	<i>AL(+)</i>	<i>AL(-)</i>	<i>AL(+)</i>	<i>AL(-)</i>	<i>AL(+)</i>	<i>AL(-)</i>
<i>IgG</i>						
Media (DE)	39,8(53,6)*	24,1(21,9)	199(348)#	45(116)	60(135)&	9(24)
Valores extremos	0,1-284	0,1-120	0-1673	0-485	0-1123	0-105
Positivo (%)	64,7	69,2	37,8	15,4	24,8	8,0
<i>IgM</i>						
Media (DE)	28,5(60,3)	32,7(53,6)	166(334)	202(377)	56(213)	6(36)
Valores extremos	0,1-560	0,1-370	0-1783	0-1716	0-1375	0-270
Positivo (%)	48,7	72,3	34,4	40,3	12,7	3,2

AL(+) versus AL(-) (*: $p=0,02$; #: $p<0,0001$; &: $p=0,004$)

Cuando se consideró la prevalencia de resultados positivos, se observó que los pacientes AL(-) tenían mayor frecuencia de aCL-IgM comparados con los pacientes AL(+) ($p<0,003$). Por el contrario, los pacientes AL(+) presentaron mayores frecuencias de anti- β_2 GPI-IgG ($p<0,002$), anti-II-IgG ($p<0,01$) y anti-II-IgM ($p<0,04$). Esto sugiere que la presencia de los anticuerpos antiproteínas (especialmente de isotipo IgG) se asocia fuertemente con la actividad de AL.

Relación de los aFL con la concentración sérica de β_2 GPI

En una primera etapa se evaluaron los niveles de esta proteína en sueros y plasmas de 10 controles normales y de 10 pacientes con aFL. No hubo diferencias en los resultados obtenidos con sueros o plasmas ($270,8 \pm 32,9$ vs $265,2 \pm 36,4$ $\mu\text{g/ml}$; respectivamente). Por lo tanto, se decidió medir la concentración de β_2 GPI en las muestras de sueros provenientes de 158 pacientes con aFL. Los pacientes anti- β_2 GPI(+) ($n=54$) tuvieron niveles de esta proteína muy similares a los obtenidos en los 104 pacientes anti- β_2 GPI(-) ($267,2 \pm 62,2$ vs $245,9 \pm 62,0$ $\mu\text{g/ml}$; $p=ns$). Estos resultados indican que estos autoanticuerpos no afectan la depuración normal de la

β_2 GPI. Dentro de la población estudiada, se detectó sólo un caso con una deficiencia severa de β_2 GPI ($<10 \mu\text{g/ml}$). Este resultado fue confirmado en dos muestras diferentes obtenidas en un periodo de seis meses. Esta paciente se caracterizaba por presentar solamente un AL(+) con resultados negativos en los ELISAs para anticuerpos antiproteínas y aCL. Además no tenía historia de eventos trombóticos.

Prevalencia de aFL y anticuerpos antiproteínas en pacientes con enfermedades autoinmunes o misceláneas

Los pacientes con *SAF primario* tuvieron mayores títulos de aCL-IgG que los pacientes del grupo de *misceláneas* ($45,4 \pm 55,9$ vs $23,6 \pm 35,1$ uGPL; $p<0,02$). Lo mismo sucedió para los anti- β_2 GPI-IgG (DO: $0,208 \pm 0,352$ vs $0,101 \pm 0,236$; $p<0,04$). Para el isotipo IgM no se encontraron diferencias significativas así como tampoco para ambos isotipos de anti-II. La prevalencia (Tabla 16) de anti- β_2 GPI fue mayor en el grupo con SAF primario, pero la diferencia no alcanzó significación estadística.

Tabla 16. Prevalencia de resultados positivos en el ensayo de AL y en los ELISAs para aCL y antiproteínas (IgG y/o IgM) en los diferentes grupos de *pacientes con aFL*.

	<i>AL(+)</i>	<i>aCL(+)</i>	<i>anti-β_2GPI(+)</i>	<i>anti-II(+)</i>
SAF primario	64	77	47	22
n=92	72,7%	83,7%	51,1%	25,3%
SAF secundario a LES	19	26	20	11
n=28	73,1%	92,8%	74,1%	42,3%
LES sin SAF	25	45	24	12
n=49	52,1%	91,8%	49,0%	25,0%
Misceláneas	48	47	21	13
n=64	81,3%	73,4%	33,9%	20,9%

Cuando los pacientes con *SAF secundario a LES* se compararon con los pacientes con *LES sin SAF*, se observaron diferencias solamente en los niveles de aCL y de anti- β_2 GPI. Los pacientes con SAF secundario tuvieron títulos más altos de aCL-IgG ($50,7 \pm 66,3$ vs $27,3 \pm 25,5$ uGPL; $p<0,04$), aCL-IgM ($77,4 \pm 124,2$ vs $31,4 \pm 48,4$ uMPL; $p<0,03$), anti- β_2 GPI-IgG (DO: $0,240 \pm 0,375$ vs $0,092 \pm 0,232$; $p<0,04$)

y anti- β_2 GPI-IgM ($0,472 \pm 0,567$ vs $0,206 \pm 0,395$; $p < 0,02$) que los LES sin SAF. Los pacientes con SAF secundario presentaron además una tendencia (Tabla 16) a tener mayor frecuencia de AL y de resultados positivos en los ELISAs para anticuerpos antiproteínas, pero sin alcanzar significación estadística.

En el grupo control de 50 pacientes con *LES y aFL(-)*, solamente tres pacientes (6,0%) presentaron anticuerpos antiproteínas. Uno de ellos tenía anti- β_2 GPI-IgG débil (DO: 0,103), otro anti- β_2 GPI-IgM débil (DO: 0,091) y el tercer paciente anti-II-IgG a título moderado (DO: 0,207).

Los pacientes con *SAF secundario a LES* comparados con aquellos con *SAF primario*, presentaron niveles más altos de aCL-IgM ($77,4 \pm 124,2$ vs $19,8 \pm 27,1$ uMPL; $p < 0,001$) y de anti- β_2 GPI-IgM (DO: $0,472 \pm 0,567$ vs $0,115 \pm 0,210$; $p < 0,001$). Sin embargo, las frecuencias de resultados positivos para el AL y los anticuerpos medidos por ELISA no mostraron diferencias significativas. No se observaron diferencias en los títulos de ningún anticuerpo cuando se compararon los pacientes del grupo de *misceláneas* y aquellos con *LES sin SAF*. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 16, la frecuencia de AL(+) fue mayor en los pacientes con *misceláneas* ($p < 0,005$) mientras que la de aCL(+) fue más alta en los pacientes con LES sin SAF ($p < 0,03$).

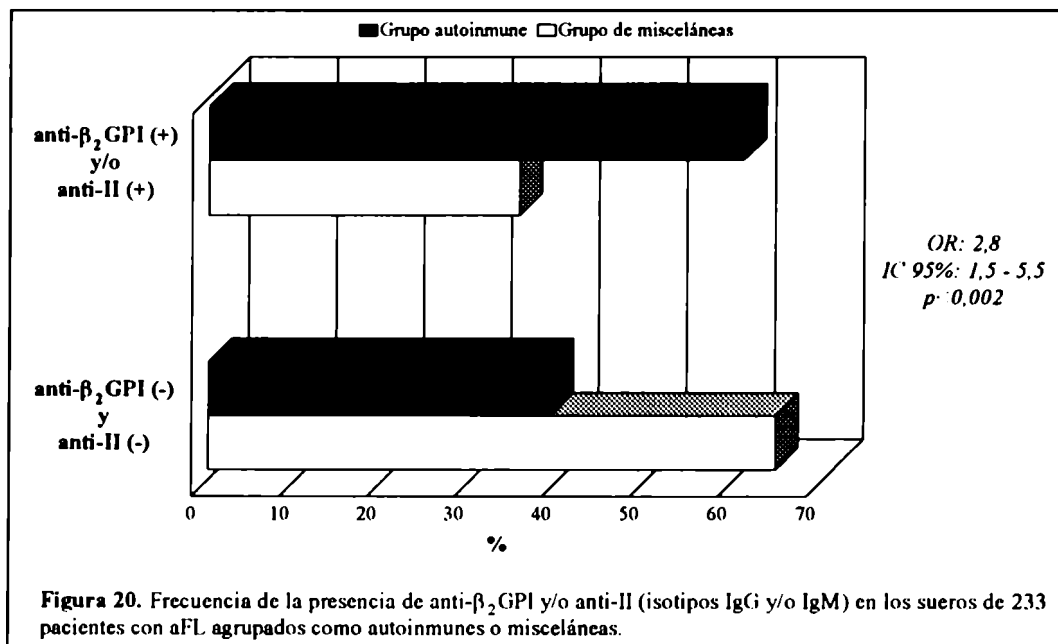
La Tabla 17 muestra el perfil de positividad de los ensayos para la detección de los anticuerpos contra las dos proteínas que han sido involucradas en la actividad del AL. El análisis se realizó en los sueros de 149 *pacientes AL(+)*, en los cuales se pudieron determinar los dos isotipos de ambos anticuerpos.

Tabla 17. Perfil de reactividad contra protrombina y β_2 GPI humana por ELISA de los sueros de 149 pacientes con actividad de AL.

	<i>anti-II(+)</i> <i>solamente</i>	<i>anti-β_2GPI(+)</i> <i>solamente</i>	<i>anti-β_2GPI</i> <i>y anti-II(+)</i>	<i>anti-β_2GPI</i> <i>y anti-II(-)</i>
SAF	8	23	20	26
n=77	10,4%	29,9%	26,0%	33,7%
LES sin SAF	3	5	8	9
n=25	12,0%	20,0%	32,0%	36,0%
Misceláneas	1	6	10	30
n=47	2,1%	12,8%	21,3%	63,8%

Los anti-II (solos o en combinación con los anti- β_2 GPI) se detectaron en el 36-44% de los pacientes con SAF o LES sin SAF y en el 23% del grupo de misceláneas. Los anti- β_2 GPI (solos o en combinación con los anti-II) se presentaron en el 53-56% de los pacientes con enfermedades autoinmunes y sólo en el 34% de aquellos del grupo de misceláneas. Estos resultados sugieren que la actividad de AL se relacionaría con estos autoanticuerpos en el 65,7% (67/102) de los pacientes del grupo autoinmune y solamente en el 36,2% (17/47) de los pacientes del grupo de misceláneas (OR 3,4; IC 95% 1,5-7,4; $p=0,001$).

En la *población total* de pacientes ($n=233$) con aFL (AL y/o aCL) también se encontró que la frecuencia de positividad de los anti- β_2 GPI y/o anti-II (IgG y/o IgM) eran significativamente mayores en los pacientes del grupo autoinmune (SAF y LES sin SAF) respecto a los del grupo de misceláneas (60,9% vs 35,4%; OR 2,8; IC 95% 1,5-5,5; $p<0,002$) (Figura 20).



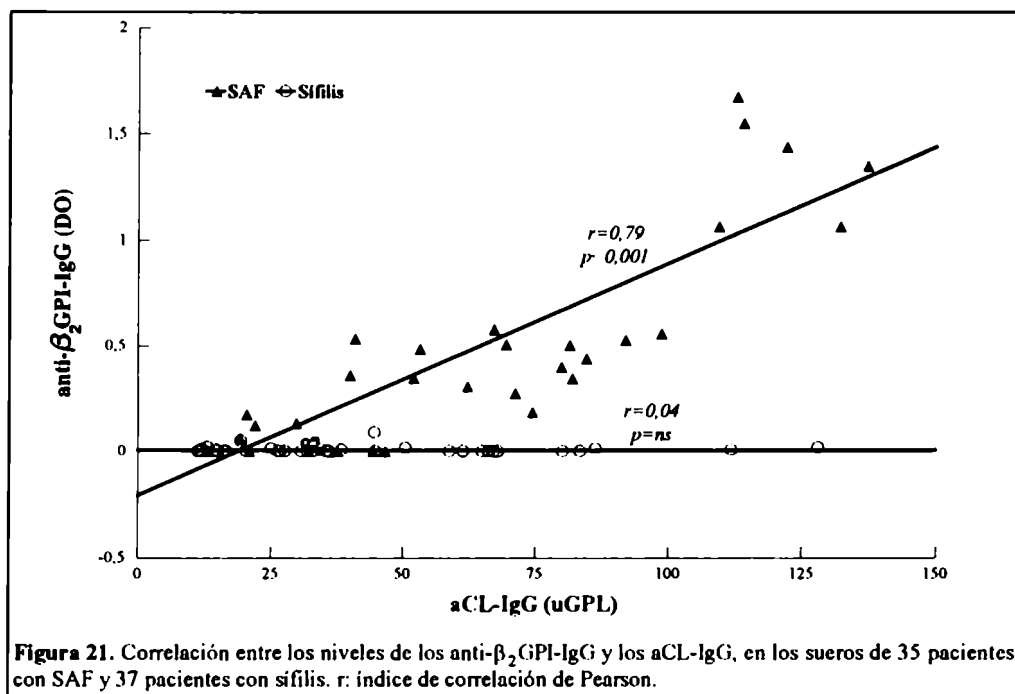
El análisis de los pacientes con SAF comparados con aquellos sin complicaciones clínicas asociadas al SAF, también demostró que la presencia de anti- β_2 GPI y/o anti-II (IgG y/o IgM) era mayor en el grupo con SAF (OR 2,1; IC 95% 1,2-3,7; $p=0,009$). Además se demostró que los 117 pacientes que tenían presencia de aCL combinada con anti- β_2 GPI y/o anti-II(+) presentaban más frecuentemente las complicaciones clínicas relacionadas al SAF comparados con los 70 pacientes con aCL(+) y resultados negativos para anti- β_2 GPI y anti-II (OR 2,0; IC 95% 1,1-3,8; $p=0,03$).

Prevalencia de aFL y anticuerpos antiproteínas en pacientes con infecciones

Comparación entre SAF y sífilis

Para este análisis se seleccionaron 35 pacientes con SAF y 55 pacientes con sífilis. En el grupo con sífilis se encontró que 37 pacientes tenían aCL-IgG(+) y el nivel medio de estos anticuerpos fue de 42,3 (DE: 28,9) uGPL, mientras que el título en el grupo con SAF, todos aCL-IgG (+), fue de 68,6 (DE: 36,0) uGPL.

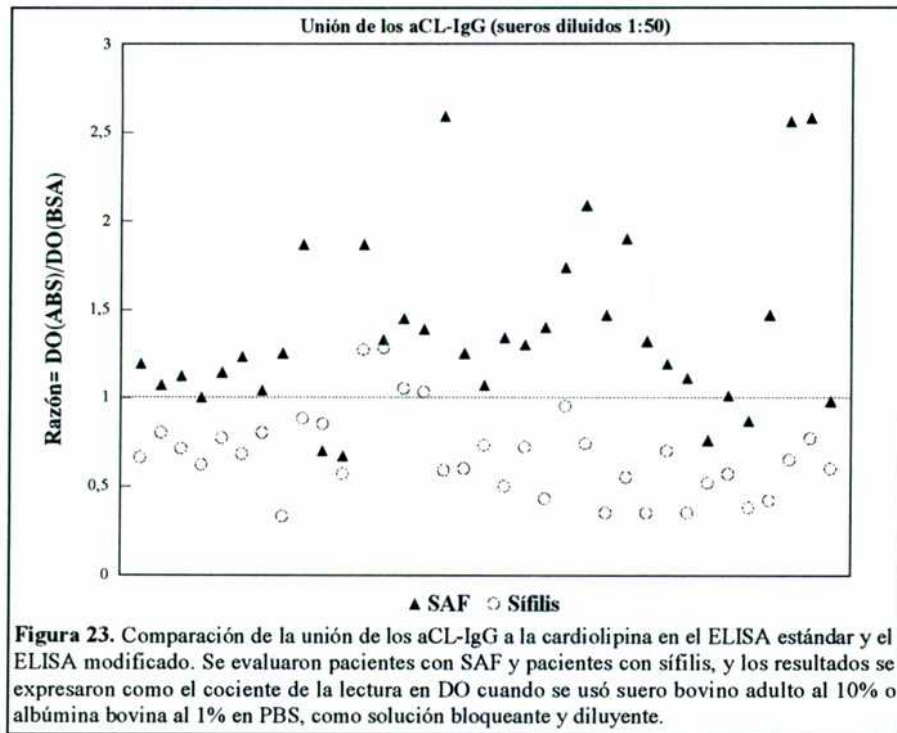
Los anti- β_2 GPI de isotipo IgG fueron positivos en 29 de los 35 sueros aCL-IgG(+) de los pacientes con SAF seleccionados. En este grupo el nivel medio de DO de los anti- β_2 GPI fue de 0,546 (DE: 0,503). La correlación entre los títulos de aCL-IgG y la DO de anti- β_2 GPI-IgG fue muy buena (Figura 21) y el valor del índice ($r=0,79$) fue muy similar al obtenido previamente (página 91) en la población total de los pacientes con aCL(+) ($n=195$; $r=0,74$).



De los 37 pacientes con sífilis y aCL-IgG(+), solamente 1 presentó resultado positivo débil en el ELISA para anti- β_2 GPI (DO: 0,090). Como se observa en la Figura 21, no se encontró correlación ($r=0,04$) entre los niveles de anti- β_2 GPI y el título de aCL en los 37 pacientes con sífilis y aCL-IgG(+).

Estudios de los aCL-IgG con ELISAs modificados

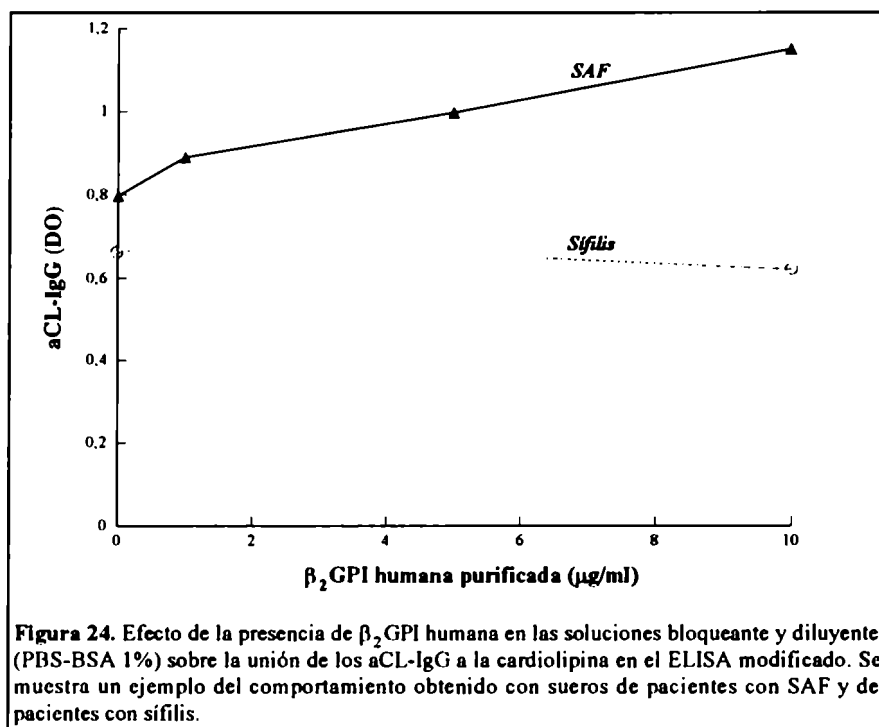
El ELISA estándar para aCL utiliza suero bovino adulto, el cual provee los cofactores proteicos que pueden influir la interacción de la CL con los anticuerpos presentes en los pacientes con SAF o sífilis. Por ese motivo se comparó la actividad de unión a CL usando el ELISA estándar y el ELISA modificado (soluciones basadas en albúmina). La Figura 23 muestra los resultados de esta comparación. Se observó que en los pacientes con SAF la presencia de suero bovino aumentó fuertemente ($\geq 20\%$) la unión en el 60,0% (21/35) de los sueros (razón ABS/BSA: 1,20-2,56). Por el contrario, el suero bovino mostró un fuerte efecto inhibitorio ($\geq 20\%$) en la unión de 29/37 (78,4%) sueros de pacientes con sífilis (razón ABS/BSA: 0,33-0,80).



Considerando los resultados anteriores, se decidió evaluar el *efecto de la presencia de β_2 GPI* sobre la unión de los anticuerpos a la CL. Para ello se determinó la reactividad a la CL usando soluciones basadas en albúmina, a las cuales se les añadió β_2 GPI humana purificada.

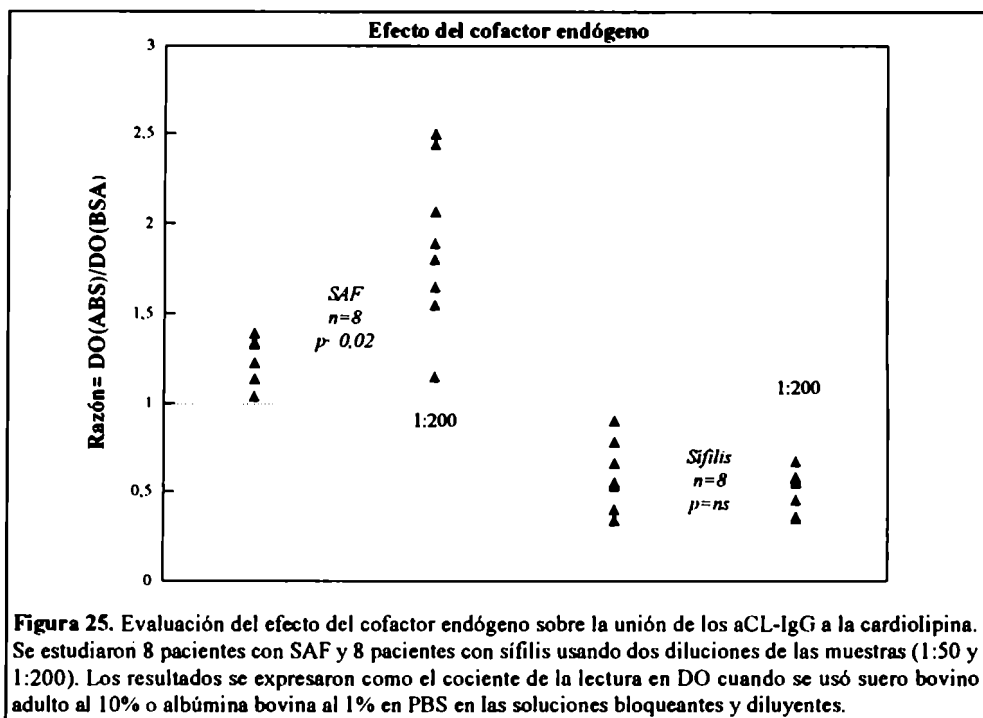
La Figura 24 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con 10 sueros de pacientes con SAF o sífilis. En la mayoría de los sueros de pacientes con SAF se observó un aumento en la unión que era dependiente de la concentración del cofactor. Por el contrario, en los sueros de pacientes con sífilis no se obtuvieron cambios significativos a las distintas concentraciones de β_2 GPI testeadas. La observación de

una gran unión a la CL en la ausencia del cofactor puede ser explicada por la presencia de la β_2 GPI endógena aportada por el suero del paciente. Hay que considerar que usando la dilución 1:50 de los sueros, la concentración resultante de β_2 GPI es de aproximadamente 4 $\mu\text{g/ml}$.



Con el objetivo de evaluar el *efecto del cofactor endógeno* presente en las muestras ensayadas, realizamos una comparación de la unión a la CL utilizando dos diluciones diferentes de los sueros. Esta comparación se llevó a cabo en los ELISAs estándar (soluciones basadas en suero bovino) y modificado (soluciones basadas en albúmina).

En los sueros de pacientes con SAF el aumento inducido por la presencia de suero bovino en el ensayo era mucho más evidente cuando la muestra estaba diluida 1:200 respecto a cuando lo estaba 1:50 ($p < 0,02$; Figura 25). La explicación surge de considerar que en la dilución más alta del suero del paciente la cantidad de β_2 GPI endógena es cuatro veces menor que en la dilución estándar, por lo que el aumento debido al cofactor provisto por el suero bovino se hace más evidente.



La Tabla 18 muestra el ejemplo obtenido con suero de un paciente con SAF, el que se testeó en cuatro diluciones crecientes. Como se observa en la Figura 25, el grado de inhibición mediado por el suero bovino en la unión a CL en los sueros de pacientes con sífilis, no se modificó significativamente cuando se compararon las diluciones 1:50 y 1:200.

Tabla 18. Ejemplo de unión a CL del suero de un paciente con SAF. Se indican las concentraciones de β_2 GPI aportadas por la muestra diluida y por las soluciones basadas en ABS al 10%. Las concentraciones fueron calculadas considerando una concentración de β_2 GPI sérica normal (200 μ g/ml).

Dilución de la muestra	ABS 10% (20 μ g/ml de β_2 GPI)	BSA al 1%	ABS/BSA
1:50 (4 μ g/ml de β_2 GPI)	DO: 1,203	DO: 1,055	1,14
1:100 (2 μ g/ml de β_2 GPI)	DO: 1,030	DO: 0,797	1,29
1:200 (1 μ g/ml de β_2 GPI)	DO: 0,642	DO: 0,263	2,44
1:400 (0,5 μ g/ml de β_2 GPI)	DO: 0,289	DO: 0,099	2,92

Discusión de los resultados de la Parte 2

Los resultados obtenidos demostraron que los anticuerpos dirigidos contra β_2 GPI y protrombina humana son frecuentemente detectados en pacientes con aFL. Más aún, una muy buena correlación fue encontrada entre los aCL y los anti- β_2 GPI. Esta relación se halló tanto para los anticuerpos de isotipo IgG como los de isotipo IgM y es coincidente con lo encontrado por otros autores.^{232,233,235-237,242,243} La presencia simultánea de ambos anticuerpos (aCL y anti- β_2 GPI) en un mismo suero sugiere que ellos podrían ser los mismos anticuerpos que se detectan en diferentes ensayos o que los dos anticuerpos existen como entidades diferentes. Los anti-II estaban presentes en aproximadamente el 30% de los pacientes con actividad de AL y fueron principalmente de isotipo IgG. La falta de correlación de los aCL y los anti- β_2 GPI con los anti-II indica que estos últimos están en cierta manera relacionados con los primeros, por estar dirigidos contra proteínas que unen FL, pero son diferentes. Los datos obtenidos sobre la prevalencia de anti-II son coincidentes con lo publicado por otros autores. Sin embargo, la frecuencia reportada varía entre un 21%⁶³ y un 55%.²⁴⁰

Los anticuerpos antiproteínas (anti-II y anti- β_2 GPI) fueron hallados frecuentemente asociados a los aFL en pacientes con enfermedades autoinmunes. En cambio, los aFL sólo (sin la presencia concomitante de estos anticuerpos antiproteínas) se detectaron generalmente en pacientes con misceláneas o en sujetos aparentemente sanos. Más aún, la actividad de AL en el grupo autoinmune (SAF y/o LES) se asoció en el 60-70% de los casos con los anticuerpos antiproteínas, mientras que sólo lo hizo en el 30-40% de los pacientes con misceláneas. Estos resultados están básicamente de acuerdo a los presentados por Arvieux y col.,²⁴⁰ aunque hay ciertas diferencias en la frecuencia de positividad de estos anticuerpos que probablemente se deban sobre todo a diferencias en las poblaciones estudiadas. En el grupo de los pacientes con misceláneas había un caso de aFL inducidos por el tratamiento con clorpromazina. Este paciente presentaba AL y aCL-IgM de alto título y se encontró además una fuerte reactividad en los ELISAs para anti-II y anti- β_2 GPI de isotipo IgM. Esta similitud entre los aFL autoinmunes y los inducidos por drogas coincide con la ya reportada por otros investigadores.^{60,240}

El ensayo de anti- β_2 GPI permitió distinguir claramente los aCL presentes en los pacientes con SAF de aquellos detectados en pacientes con sífilis. La falta absoluta de correlación entre ambos ensayos en los pacientes con sífilis indica que los aCL en este grupo son independientes de la β_2 GPI. Por lo tanto los datos sugieren que la realización de ambos ELISAs sería de gran valor en el estudio de los aFL. Resultados

similares han sido reportados en pacientes con otras infecciones como tuberculosis e infección a *Klebsiella*.²⁴⁴ Sin embargo, hay un estudio reciente que muestra datos discordantes con una prevalencia del 30% de anti- β_2 GPI en pacientes con sífilis secundaria.²⁴⁵ La ausencia de anticuerpos antiproteínas en los pacientes con sífilis que fueron evaluados en el trabajo de tesis se confirmó también en el ensayo de anti-II.

Los pacientes con HIV mostraron un perfil de reactividad algo diferente del observado en los pacientes con otras infecciones. Los anti- β_2 GPI fueron encontrados en el 25% y los anti-II en el 10% de los pacientes. Sin embargo, en la mayoría de ellos los anticuerpos estaban presentes en títulos débiles. La presencia de estos anticuerpos antiproteínas podría ser explicada en base al severo deterioro inmunológico inducido por la infección con el HIV.

Los resultados usando ELISAs modificados para aCL confirmaron que la mayoría de los aCL presentes en pacientes con SAF necesitan del cofactor proteico (β_2 GPI), aportado por el suero bovino agregado o en forma purificada, para la máxima expresión de la interacción de los anticuerpos con la CL. Sin embargo, en algunos sueros de pacientes con SAF este requerimiento fue menos notorio. Esto confirma la marcada heterogeneidad de los aCL, como fue demostrado en el estudio de Amiral y col.²¹⁴ El menor requerimiento del cofactor que se observó en algunos sueros podría ser debido a la presencia de una cantidad de cofactor endógeno suficiente para llevar a cabo la interacción de los anticuerpos con la CL. Los aCL de pacientes con sífilis tuvieron un comportamiento opuesto al de los pacientes con SAF. En un forma más homogénea, se pudo observar que la presencia de la β_2 GPI tenía un efecto inhibitorio sobre su unión a la CL. Similares conclusiones fueron reportadas en otros estudios.⁹⁰⁻⁹²

En 1992, Galli y col.²⁴⁶ encontraron que los niveles plasmáticos de β_2 GPI estaban aumentados en los pacientes con AL. Los resultados obtenidos en el trabajo de tesis no mostraron ninguna diferencia en los niveles séricos de β_2 GPI relacionados con la actividad de AL ni tampoco con la presencia de anti- β_2 GPI. Por lo tanto, estos datos sugieren que los anticuerpos circulantes en estos pacientes no tendrían influencia en la depuración normal de esta proteína.

Parte 3: Especificidad antigénica de las IgGs purificadas

Purificación de las IgGs

Las fracciones IgG purificadas por afinidad a columnas de proteína A-sefarosa y los aCL purificados por afinidad a columnas de cardiolipina-octil-sefarosa fueron sometidos a SDS-PAGE para determinar su pureza. La siguiente figura muestra un ejemplo de las electroforesis.

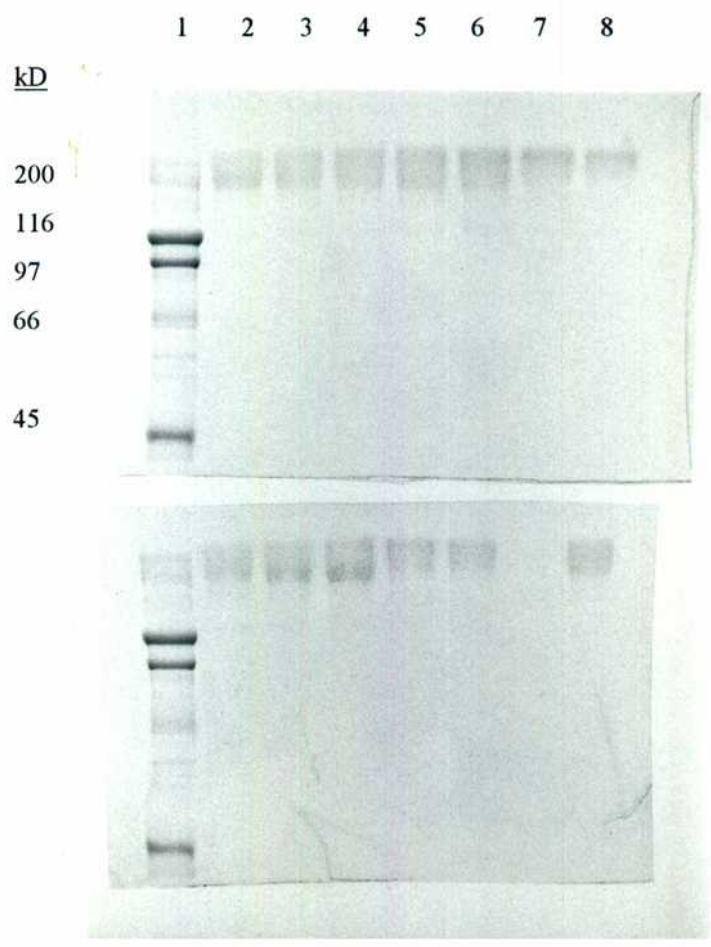


Figura 26. SDS-PAGE bajo condiciones no reducidas de las IgGs purificadas (ver Materiales y Métodos). La línea 1 en cada gel corresponde a los estándares de peso molecular, cuyos valores se indican en el lado izquierdo de la figura. Las líneas 2 a 8 en el primer gel y 2 a 5 en el segundo gel corresponden a diferentes IgGs (siembra: 1 μ g) obtenidas por afinidad a proteína A-sefarosa. Las líneas 6 y 8 del segundo gel corresponden a dos IgGs (1 μ g) purificadas por afinidad a CL-octil-sefarosa.

En una etapa posterior se analizó si las fracciones IgG estaban libres de contaminación con β_2 GPI. Para ello se usó la técnica de Western blot usando secuencialmente un antisuero de conejo anti- β_2 GPI humana y un anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa para revelar la presencia de la proteína. Una solución de β_2 GPI fue usada como control positivo. En la Figura 27 se muestra un ejemplo de los resultados.

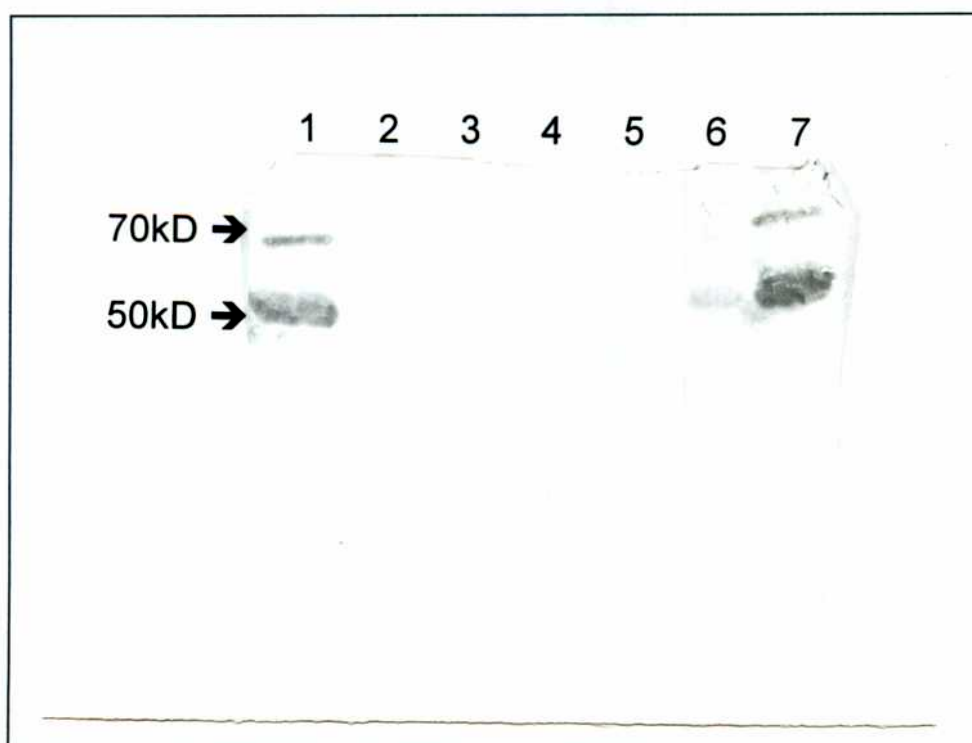


Figura 27. Análisis por Western blot de las IgGs purificadas, realizado como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Las líneas 1 y 7 corresponden a la preparación de β_2 GPI humana (siembra: 2 μ g) utilizada como control positivo. La línea 6 corresponde a la siembra de una dilución de plasma normal (aproximadamente 0,5 μ g de β_2 GPI). La línea 2 es una aCL-IgG (20 μ g de proteína) purificada por CL-octil-sefarosa. Las líneas 3 a 5 son diferentes IgGs (50 μ g de proteína) purificadas por afinidad a la proteína A-sefarosa. En el lado izquierdo de la figura se indica el peso molecular en kD. El PM de la β_2 GPI en condiciones no reducidas es de 50 kD y corresponde a la fracción mayoritaria observada. La banda más pequeña de 70 kD podría deberse a una pequeña cantidad de la proteína en estado reducido.

De esta manera pudimos descartar la presencia de la β_2 GPI como contaminante en todas las preparaciones de las IgGs purificadas. Esto fue muy importante en la evaluación de la actividad y la especificidad antigénica de las mismas.

ELISAs con las IgGs purificadas

Unión a CL, CL- β_2 GPI o β_2 GPI

En una primera etapa se trató de determinar la especificidad antigénica de las IgGs purificadas de 2 pacientes con sífilis y de 10 pacientes con SAF. Se realizó un ELISA modificado utilizando placas irradiadas y soluciones de BSA para eliminar el efecto de los cofactores proteicos presentes en el suero bovino. Se evaluó la unión a cardiolipina sola, al complejo cardiolipina- β_2 GPI y a β_2 GPI sola. En la Tabla 19 se muestran los resultados. Las IgGs provenientes de pacientes con sífilis reaccionaron con la CL y la unión fue fuertemente inhibida cuando la CL se presentaba complejada con la β_2 GPI. Además se demostró que estas IgGs no reaccionaban con la β_2 GPI, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos con los sueros de los pacientes.

Tabla 19. Unión de las IgGs purificadas a diferentes antígenos en ELISA utilizando BSA y placas irradiadas. Los resultados expresados en DO son el promedio de dos experimentos diferentes y representan la actividad real luego de descontar la DO de la IgG del pool normal. (#): IgG purificada por afinidad a cardiolipina-octil-sefarosa.

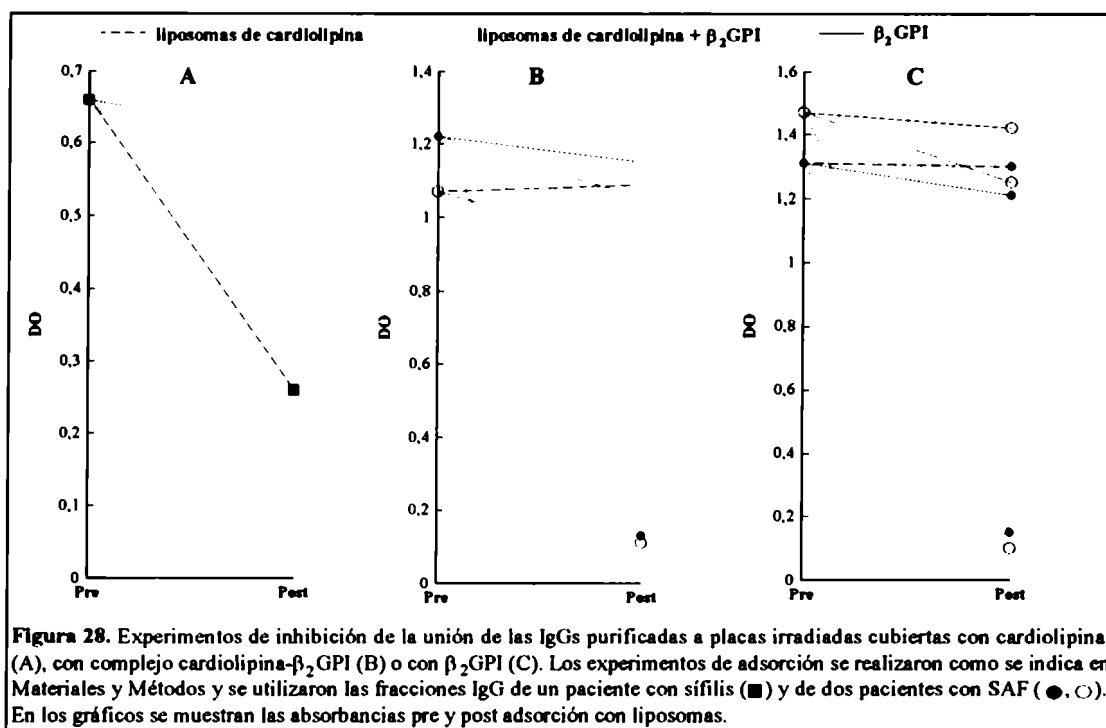
<i>Paciente</i>	<i>Placa cubierta con</i>		
	<i>Cardiolipina</i>	<i>Cardiolipina + β_2GPI</i>	<i>β_2GPI</i>
Síf-1	0,560	0,135	0
Síf-2	0,710	0,215	0
SAF-1	0	1,335	1,563
SAF-2	0	1,310	1,410
SAF-3	0	0,725	0,974
SAF-4	0	0,630	0,980
SAF-5	0	0,530	0,800
SAF-6	0,060	0,350	0,320
SAF-7	0,120	1,420	1,640
SAF-8	0,050	0,715	0,782
SAF-9	0,300	0,430	0,399
SAF-10	0,330	0,380	0
SAF-1 (#)	0	0,805	0,780
SAF-2 (#)	0,150	1,150	1,060
SAF-3 (#)	0,070	0,920	0,810

Por el contrario, 8 de las primeras 10 IgGs de pacientes con SAF evaluadas mostraron altos valores de DO cuando el antígeno empleado en el ELISA fue la β_2 GPI o el complejo CL- β_2 GPI. Estas IgGs no presentaron reactividad con CL sola. En el caso del paciente 9 con SAF, se observó que la IgG mostraba un grado de unión muy similar a los tres antígenos utilizados. La IgG del último paciente (SAF-10) presentó un patrón diferente al de las otras, pues reaccionó en forma similar con la CL y el complejo CL- β_2 GPI, pero no con la β_2 GPI sola. Este paciente también presentó un resultado negativo en la muestra de suero en el ELISA para anti- β_2 GPI.

Las tres IgGs de pacientes con SAF purificadas por afinidad a columnas de CL-octil-sefarosa reaccionaron con la β_2 GPI o con el complejo CL- β_2 GPI, presentando un perfil de unión similar al de las IgGs purificadas por proteína A-sefarosa de los mismos.

Experimentos de inhibición

Para confirmar la especificidad de la unión de los anticuerpos de pacientes con sífilis y de aquellos de pacientes con SAF, se realizaron estudios de adsorción con liposomas de CL en la presencia o ausencia de β_2 GPI.



En el caso de la IgG purificada de un paciente con sífilis se observó que la preincubación con liposomas de CL inhibía en un 60% la unión a la CL pegada en la placa de ELISA (Figura 28), mientras que cuando se utilizaron liposomas preparados en presencia de β_2 GPI, se observó una inhibición del 40%. Por el contrario, soluciones con altas concentraciones de β_2 GPI en ausencia de FL no mostraron ningún efecto inhibitorio.

En el caso de las dos IgGs de pacientes con SAF se observó que solamente la preincubación con liposomas de CL en presencia de β_2 GPI era capaz de producir un fuerte efecto inhibitorio (80-90%) sobre la unión a β_2 GPI o al complejo CL- β_2 GPI. No se demostró ningún efecto cuando se usaban altas concentraciones de β_2 GPI soluble o liposomas de CL en ausencia de la β_2 GPI.

Unión a CL, β_2 GPI o protrombina

En la Tabla 20 se presentan los datos de DO obtenidos en los ELISA usando como antígenos CL, β_2 GPI y protrombina cuando se ensayaron las IgGs purificadas de 23 pacientes con aFL.

Para las IgGs de pacientes con AL se obtuvieron diferentes perfiles de reactividad. La mayoría de ellas (9/16) se unieron fuertemente a β_2 GPI y en dos casos (IgG 9 y 14) también a la protrombina. La IgG del paciente 1 presentó reactividad exclusivamente con la protrombina. El resto de las IgGs se unieron débilmente con protrombina o cardiolipina o no reaccionaron con ninguno de los antígenos evaluados a las concentraciones de IgG utilizadas. Es importante considerar que ninguna de estas IgGs presentó valores altos de DO cuando se evaluó la unión a la CL. Dos (pacientes 7 y 16) de las tres IgGs que fallaron en reaccionar con los antígenos por ELISA provenían de pacientes con aFL del grupo de misceláneas. En cambio, las otras IgGs purificadas con actividad de AL eran de pacientes con LES o SAF.

Las 7 IgGs obtenidas de pacientes aCL(+)AL(-) mostraron también un perfil heterogéneo de reactividad. En tres casos se observó una unión moderada o fuerte con CL sola y en otros dos casos reactividad fuerte con β_2 GPI (uno de ellos presentaba unión a CL). En este grupo de IgGs también hubo dos casos (pacientes 17 y 21) que presentaron resultados negativos con todos los antígenos ensayados.

Tabla 20. Especificidad antigénica de 23 fracciones de IgGs purificadas. Se utilizaron placas cubiertas con diferentes antígenos y ELISAs modificados (BSA). Los resultados se expresaron en DO y representan la actividad real luego de restar la DO de la IgG del pool normal. Los mismos son promedio de dos experiencias diferentes. Además se indican los datos de AL y aCL-IgG de los pacientes evaluados.

<i>Paciente</i>	<i>AL</i>	<i>aCL (uGPL)</i>	<i>Placas cubiertas con</i>		
			<i>CL</i>	<i>β₂GPI</i>	<i>II</i>
1		3,0	0	0,124	0,718
2		105,0	0	0,704	0,051
3		100,0	0	1,306	0
4		4,0	0	0	0
5		132,2	0	1,292	0,163
6		1,0	0	0	0,068
7		0,1	0	0	0
8		195,8	0	1,568	0
9		141,2	0	1,490	0,434
10		74,5	0	0,994	0
11		112,8	0,120	1,690	0,100
12		37,4	0,100	0,380	0
13		2,4	0,106	0	0,105
14		69,5	0	0,880	0,388
15		5,0	0,180	0	0
16		2,9	0	0	0
17		49,2	0	0	0
18		37,2	0,191	0	0
19		52,7	0,686	0	0
20		32,2	0,380	0	0
21		28,7	0	0	0
22		53,2	0	0,860	0
23		22,1	0,308	0,419	0

Actividad anticoagulante de las IgGs purificadas

En las mismas 23 IgGs purificadas en las cuales se evaluó la especificidad antigénica por ELISA, se determinó la capacidad de las mismas para prolongar los tests de coagulación. En la Figura 29 se muestran los resultados del efecto sobre plasma normal de las 16 IgGs de pacientes con AL y de las 7 IgGs de aquellos sin AL comparados con 2 IgGs controles obtenidas de pools normales.

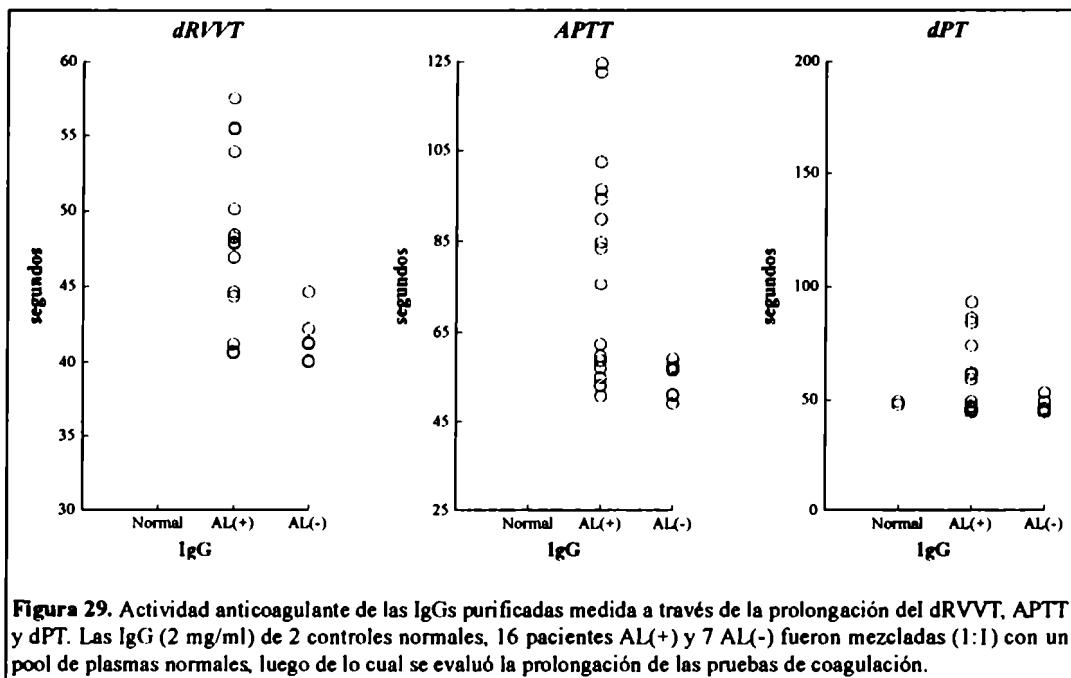


Figura 29. Actividad anticoagulante de las IgGs purificadas medida a través de la prolongación del dRVVT, APTT y dPT. Las IgG (2 mg/ml) de 2 controles normales, 16 pacientes AL(+) y 7 AL(-) fueron mezcladas (1:1) con un pool de plasmas normales, luego de lo cual se evaluó la prolongación de las pruebas de coagulación.

Las IgGs de pacientes con AL(-) no prolongaron los tests de coagulación, aunque en los tres ensayos se observó que 1 fracción (diferente para cada prueba) producía una leve prolongación comparada con los resultados de las IgGs control. Por el contrario, las IgGs purificadas de pacientes AL(+) retenían su capacidad de alterar los ensayos de coagulación en 13/16 (dRVVT) y 11/16 (APTT y dPT). Dos de las 16 IgGs no prolongaron ninguna de las pruebas ensayadas y esto podría deberse a que la actividad de AL en esos plasmas fuera a expensas de anticuerpos de isotipo IgM.

Discusión de los resultados de la Parte 3

Los experimentos con IgGs purificadas permitieron conocer la especificidad antigénica de los anticuerpos y confirmar las sugerencias dadas por los resultados obtenidos en los ELISAs (estándar y modificado) con los sueros de los pacientes.

Las preparaciones de IgG obtenidas de pacientes con sífilis y aCL-IgG (+), reaccionaron específicamente con la CL en el ELISA modificado y esta unión fue claramente menor cuando el FL se presentaba en la placa unido a la β_2 GPI. Algunos investigadores creen que esta inhibición es debida a la competición entre los anticuerpos y la β_2 GPI por estructuras similares en la molécula del fosfolípido.⁹⁰ Otra posibilidad es que los anticuerpos estén dirigidos contra epitopes presentes en la CL nativa, los cuales se modifican como resultado del cambio conformacional sufrido por la CL y la proteína cuando interactúan.⁸⁸ Confirmamos la especificidad de los aCL de sífilis por la CL mediante la adsorción de los anticuerpos purificados por liposomas de CL. Demostramos además la falta de reactividad de las IgGs purificadas de pacientes con sífilis con la β_2 GPI pegada a la placa.

Las IgGs o los aCL purificados de la mayoría de los pacientes con SAF reaccionaron fuertemente con el complejo CL- β_2 GPI o con la β_2 GPI adsorbida en placas irradiadas y no se unieron a la CL en ausencia del cofactor proteico. Estos resultados son coincidentes con los presentados por otros autores.^{235-237,247,248} La especificidad de la unión de los aCL de tipo autoinmune con la β_2 GPI unida a superficies plásticas oxigenadas o a superficies fosfolipídicas fue confirmada mediante la adsorción de los anticuerpos solamente con liposomas de CL preparados en presencia de la proteína. Esto contrasta con la incapacidad de producir la inhibición cuando se usaron liposomas de CL en ausencia de β_2 GPI o la proteína soluble. Esto indicaría que estos anticuerpos solo reconocen a la proteína cuando es presentada en una determinada conformación estructural. Se observó que un bajo porcentaje de IgGs de pacientes con SAF reaccionaban con la CL y también con el complejo CL- β_2 GPI o la β_2 GPI, lo que sugiere que algunos pacientes contienen mezclas de anticuerpos con distintas especificidades. Recientemente ha sido demostrado que la inmunización de conejos con β_2 GPI induce la producción de dos poblaciones diferentes de anticuerpos en el mismo animal, unos específicos para β_2 GPI y otros para CL.²⁴⁹ Sin embargo, datos recientemente publicados por Kouts y col.²⁵⁰ sugieren que los anticuerpos inducidos por inmunización son en realidad dos tipos diferentes de anti- β_2 GPI, uno de ellos reaccionan con la β_2 GPI y los otros lo hacen también con los FL. En este último caso la unión a los FL en ausencia de β_2 GPI es debida a interacciones electrostáticas entre los FL y los anticuerpos cargados y puede ser

inhibida *in vitro* por el uso de soluciones con alta fuerza iónica. Resultados similares fueron obtenidos trabajando con anticuerpos purificados de pacientes con SAF.²⁵⁰

Los datos obtenidos mostraron que las IgGs purificadas de algunos pacientes con aFL reaccionaban específicamente con la CL y no mostraban reactividad con la β_2 GPI sola o unida a la CL. Estos resultados coincidirían con lo publicado por algunos grupos de investigadores^{88,94,95,234} sobre la especificidad de los aFL por epitopes localizados sobre la molécula de la CL. En un trabajo reciente se presentaron datos sobre la reactividad de la mayoría de los anticuerpos de pacientes con SAF con la CL mediante ensayos de cromatografía en capa fina.²⁵¹ Además en ese trabajo se detectó la presencia de anti- β_2 GPI por inmunoblotting solamente en el 20% de los pacientes y se concluyó que ambos anticuerpos (aCL y anti- β_2 GPI) son poblaciones diferentes que pueden coexistir en un mismo paciente. A fines del año 1996 se publicó un estudio en el cual se demuestra la importancia de la oxidación de los FL en la expresión del epitope reconocido por los aFL.²⁵² Los investigadores demostraron que la mayoría de los aCL se unen a la CL oxidada y a la lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada y no reconocen a los FL nativos o no modificados. Además encontraron que los anticuerpos anti-LDL oxidada obtenidos de ratones deficientes en apolipoproteína E o de pacientes con SAF reaccionaban con la CL solamente cuando se encontraba en estado oxidado. Los autores postulan que los eventos de oxidación de los FL pueden ser importantes en la fisiopatología del SAF. Estos datos son muy importantes pero no permiten esclarecer la discusión sobre el epitope reconocido por los aFL porque, como es conocido, la β_2 GPI tiene una alta afinidad por los FL principalmente cuando están en estado oxidado.

En dos casos, las IgGs purificadas (17 y 21) tenían resultados positivos en el ELISA estándar de aCL y no reaccionaron *in vitro* con ninguno de los antígenos testeados (CL o β_2 GPI humana). Esto podría explicarse por la presencia de anticuerpos que muestran especificidad por la β_2 GPI bovina, la cual está presente en el ELISA estándar de aCL.²⁵³

Solamente 3 de las 16 IgGs de pacientes con AL mostraron clara especificidad por la protrombina humana. Las IgGs de dos pacientes con AL no reaccionaron *in vitro* con CL, β_2 GPI ni protrombina. Teniendo en cuenta datos recientemente publicados podemos suponer que en esos dos casos los anticuerpos podrían estar dirigidos contra el complejo PS-protrombina.^{254,255} Además, se ha demostrado que los anticuerpos contra PS-protrombina son detectados más frecuentemente que los anti-II en los pacientes con AL.

La interpretación de la especificidad antigénica de los aFL es en algunos casos difícil de entender porque una de las características de estos anticuerpos es su

marcada heterogeneidad entre diferentes individuos y también en un mismo paciente. Esta heterogeneidad puede ser explicada en parte por la presencia de distintas subclases de IgG. Las IgG₂ se encontraron relacionadas principalmente con los anti- β_2 GPI y los anti-II, mientras que las IgG₁ e IgG₃ con los verdaderos aCL.^{240,243}

Dos grupos de investigadores presentaron resultados en lo que respecta al epítopo responsable de la interacción entre los anticuerpos y la β_2 GPI. Hunt y Krilis⁸² demostraron que el dominio V de la proteína (Figura 6) tiene una región que es reconocida por los aCL del tipo autoinmune. La importancia de este dominio fue evaluada trabajando con una variante de la β_2 GPI clivada proteolíticamente en la zona cercana a la región carboxiterminal. Encontraron que la unión de los aCL era completamente inhibida cuando se usaba la proteína clivada, por lo que concluyeron que los epítopos estaban localizados en esa región o bien el clivaje inducía una modificación en la conformación que alteraba la expresión del epítopo. Igarashi y col.⁸³ usaron mutantes de la β_2 GPI para estudiar la zona responsable de la interacción con los anticuerpos. Encontraron que el epítopo es críptico y se expone en la β_2 GPI como consecuencia de un cambio conformacional inducido por la interacción del dominio V con FL aniónicos o superficies apropiadas (placas irradiadas). El dominio IV tiene un rol fundamental en la exposición del epítopo y se demostró que éste no está presente en el dominio V. Al dominio I de la proteína también se le asigna una cierta participación en la exposición del epítopo críptico.

Parte 4: Autoanticuerpos y complicaciones clínicas del SAF

Relación con las complicaciones trombóticas

Como se indica en la Tabla 9 de la sección Materiales y Métodos, 45 de los 233 pacientes con aFL tenían una historia de trombosis venosa (TV). Cuando se realizó el análisis univariado de los factores de riesgo para TV (Tabla 21), se encontró que la presencia de anti- β_2 GPI de isotipo IgG era positiva en 24/45 (53,4%) de los pacientes con TV y esta asociación tenía un riesgo de 3,2 sobre los pacientes sin historia de trombosis. Además había una diferencia muy significativa entre ambos grupos de pacientes en lo que respecta a los niveles (DO) de los anti- β_2 GPI-IgG ($0,290 \pm 0,380$ vs $0,116 \pm 0,258$; $p < 0,0001$). Considerando la prevalencia de anti- β_2 GPI-IgG a título moderado o alto (DO > 0,150), el riesgo se incrementó a 3,8.

Tabla 21. Análisis del riesgo de la presencia de los diferentes anticuerpos en pacientes con aFL e historia de trombosis venosa.

	TV (n=45) (%)	No trombosis (n=158) (%)	OR (IC 95%)	
			Análisis univariado	Análisis multivariado
AL(+)	80,9	64,9	2,3 (0,9-5,8)	
aCL-IgG(+)	73,3	65,8	1,4 (0,6-3,2)	
>20 uGPL	66,7	42,4	2,7 (1,3-5,8)**	
aCL-IgM(+)	57,8	58,2	1,0 (0,5-2,0)	
anti- β_2 GPI-IgG(+)	53,4	26,5	3,2 (1,5-6,6)*	3,0 (1,3-6,2)**
DO > 0,150	48,9	20,2	3,8 (1,8-8,1)&	3,6 (1,7-7,0)&
anti- β_2 GPI-IgM(+)	34,1	39,1	0,8 (0,4-1,7)	
anti-II-IgG(+)	30,9	17,9	2,1 (0,9-4,8)	
anti-II-IgM(+)	14,3	8,6	1,8 (0,5-5,4)	
anti-II-IgG y/o IgM(+)	40,5	23,8	2,2 (1,1-4,7)#	ns

&: $p < 0,0005$; *: $p = 0,001$; **: $p < 0,01$; #: $p = 0,03$; ns: no significativo

No se observaron asociaciones significativas cuando se analizó la relación con los anti- β_2 GPI-IgM. La presencia de AL no mostró ser un factor de riesgo para TV en los pacientes con aFL. Tampoco resultó significativa la asociación con los aCL, independientemente del isotipo de las inmunoglobulinas. Sin embargo, los pacientes con TV presentaron mayores títulos (uGPL) de aCL-IgG que los pacientes sin trombosis ($63,4 \pm 66,9$ vs $28,6 \pm 35,0$; $p < 0,0001$). Por lo tanto, cuando se consideraron sólo los aCL-IgG a título moderado o alto (>20 uGPL), se encontró una asociación significativa con la historia de TV. Los anti-II de isotipo IgG e IgM, cuando son considerados por separado, no mostraron ser factores de riesgo para TV. Sin embargo, cuando los pacientes son analizados por la presencia de anti-II (positividad para IgG y/o IgM), se encontró que estos anticuerpos eran un factor de riesgo para TV. Las variables que resultaron significativas en el análisis univariado, fueron luego analizadas por métodos multivariados para establecer la independencia de los factores de riesgo. Se incluyeron en el análisis cuatro variables: los aCL-IgG (>20 uGPL), anti- β_2 GPI-IgG, anti- β_2 GPI-IgG ($DO > 0,150$) y los anti-II IgG y/o IgM. Luego de este análisis, solamente quedaron como factores de riesgo independientes los anti- β_2 GPI-IgG(+) y los anti- β_2 GPI-IgG a títulos moderados o altos.

Considerando a los pacientes con trombosis arterial (TA) ($n=32$) no se encontraron diferencias en los niveles ni en la prevalencia de ninguno de los anticuerpos medidos por ELISA cuando se los comparó con los pacientes sin trombosis. Únicamente se observó una tendencia a mayor prevalencia de AL en los pacientes con TA, pero sin alcanzar significación estadística ($83,3$ vs $64,9\%$; OR: 2,7; IC 95%: 0,9-9,5).

No se detectaron anti-II en ninguno de los pacientes del grupo control ($n=25$, página 59 de Materiales y Métodos) con TV y resultados negativos para aFL (AL o aCL). En el ELISA para anti- β_2 GPI se encontró solamente un resultado positivo de isotipo IgM y de bajo título (DO: 0,078), en este mismo grupo.

Relación con las complicaciones obstétricas (CO)

Se analizaron los factores de riesgo en relación al desarrollo de complicaciones obstétricas durante el embarazo en las mujeres con aFL que habían cursado al menos un embarazo. La Tabla 22 muestra los resultados del análisis univariado. La presencia del AL o de anti-II no se asoció con una historia de CO. Tampoco se encontró relación entre las CO y los aCL y anti- β_2 GPI (ambos de isotipo IgG). Por el contrario, los anti- β_2 GPI-IgM fueron más frecuentemente hallados en

aquellas mujeres con historia de pérdidas fetales o abortos recurrentes y la asociación implicaba un riesgo de 2,6 mayor que las pacientes con embarazos normales. Además, los niveles (DO) de estos anticuerpos fueron más altos en el primer grupo ($0,318 \pm 0,463$ vs $0,164 \pm 0,339$; $p < 0,04$). Esta asociación era más fuerte (OR: 3,0) cuando se consideraban solamente los anti- β_2 GPI-IgM de títulos altos (DO > 0,150).

Tabla 22. Análisis del riesgo de la presencia de los diferentes anticuerpos en mujeres con aFL e historia de uno o más embarazos.

	CO		OR (IC 95%)	
	si (n=44) (%)	no (n=89) (%)	Análisis univariado	Análisis multivariado
AL(+)	61,9	66,7	0,8 (0,3-1,9)	
aCL-IgG(+)	72,7	68,5	1,2 (0,5-2,9)	
aCL-IgM(+)	75,0	58,4	2,1 (0,9-5,2)	
>20 uMPL	47,7	25,8	2,6 (1,1-6,0)*	
anti- β_2 GPI-IgG(+)	40,9	31,5	1,5 (0,7-3,4)	
anti- β_2 GPI-IgM(+)	58,5	34,9	2,6 (1,1-6,1)*	ns
DO > 0,150	46,3	22,1	3,0 (1,3-7,3)#	2,9 (1,3-6,7)#
anti-II-IgG(+)	19,5	15,1	1,4 (0,5-3,9)	
anti-II-IgM(+)	12,2	7,0	1,8 (0,4-7,8)	

#: $p < 0,01$; *: $p = 0,01$

Las mujeres con CO tenían una tendencia a tener títulos (uMPL) mayores de aCL-IgM que aquellas con embarazos normales, pero la diferencia no alcanzó significación estadística ($49,6 \pm 99,7$ vs $29,3 \pm 45,5$; $p = ns$). Sin embargo, cuando para el análisis univariado se consideraban aquellos títulos mayores de 20 uMPL, los aCL-IgM se asociaban con la historia de CO. Mediante el análisis multivariado (Tabla 22) se encontró que el único factor de riesgo para CO que permanecía significativo e independiente era la presencia de anti- β_2 GPI-IgM a títulos moderados o altos.

En el grupo control de 25 mujeres con CO (página 59 de Materiales y Métodos) y con resultados repetidamente negativos para aFL (AL o aCL) se halló

sólo una paciente que presentaba un resultado positivo en el ELISA para anti- β_2 GPI-IgM. El título de estos anticuerpos fue alto (DO: 0,410) y la paciente presentaba una historia de 7 abortos recurrentes.

Autoanticuerpos y su relación con los tests de coagulación para AL

Del grupo total de pacientes con AL (n=156), se tomó un subgrupo de pacientes que incluía a todos los que habían sido evaluados con el panel completo de pruebas de coagulación y se analizó el perfil de estos ensayos para el diagnóstico del AL en relación a la especificidad antigénica de los anticuerpos medidos por ELISA y a las complicaciones clínicas del SAF.

Tabla 23. Perfiles de coagulación en 78 plasmas de pacientes con AL agrupados de acuerdo a la presencia de los diferentes anticuerpos detectados por ELISA.

	n	APTT				
		Actin FSL	Platelin LS	PTT-LA	dRVVT	TTI
aCL(+)	44	1,83 (0,62)#	2,18 (0,92)*	2,71 (1,07)#	1,65 (0,53)#	2,49 (1,13)*
aCL(-)	34	1,46 (0,34)	1,55 (0,26)	1,92 (0,78)	1,32 (0,35)	1,64 (0,84)
anti- β_2 GPI(+)	30	1,89 (0,68)#	2,41 (0,97)*	3,03 (1,11)*	1,69 (0,41)◆	2,94 (0,94)*
anti- β_2 GPI(-)	48	1,53 (0,38)	1,57 (0,49)	1,99 (0,77)	1,39 (0,50)	1,58 (0,82)
anti-II(+)	30	1,82 (0,66)	2,23 (1,06)◆	2,71 (1,09)	1,58 (0,41)	2,67 (1,00)*
anti-II(-)	48	1,60 (0,44)	1,69 (0,63)	2,18 (0,93)	1,45 (0,54)	1,82 (1,00)
Anticuerpos(+)	50	1,81 (0,61)◆	2,15 (0,93)*	2,70 (1,04)*	1,63 (0,52)#	2,46 (1,13)*
Anticuerpos(-)	28	1,48 (0,33)	1,49 (0,42)	1,86 (0,76)	1,29 (0,36)	1,65 (0,77)

*: p<0,001; #: p<0,005; ◆: p<0,01. Los resultados (media y DE) de APTT y dRVVT están expresados como el cociente del tiempo de coagulación del paciente y el tiempo de coagulación promedio de 50 normales. El TTI está expresado por el índice definido como la razón entre el cociente de los tiempos de coagulación del paciente y del normal obtenido con la tromboplastina diluida (1:500) y el mismo cociente obtenido con la tromboplastina sin diluir.

En la Tabla 23 se puede observar que la presencia de aCL se asoció con una mayor prolongación de todos los tests de coagulación. Además, los pacientes con aCL(+), comparados con aquellos aCL(-), presentaron mayor frecuencia de valores anormales del dRVVT (86,4 vs 52,9%; $p<0,005$). Resultados similares se obtuvieron cuando se compararon los pacientes con y sin anti- β_2 GPI. Los pacientes anti- β_2 GPI(+) presentaron una mayor frecuencia de resultados alterados del dRVVT (93,3 vs 56,2%; $p=0,001$) y también del TTI (93,1 vs 51,1%; $p<0,001$). Los anti-II se asociaron únicamente con una mayor prolongación del APTT con uno de los reactivos utilizados y del TTI. Sin embargo, los pacientes con anti-II comparados con aquellos sin anti-II, presentaron mayor frecuencia de dRVVT prolongado (86,6 vs 55,5%; $p<0,01$) y de TTI anormal (85,7 vs 59,1%; $p<0,05$). Cuando los pacientes fueron agrupados según presentaban AL y algún anticuerpo positivo por ELISA o únicamente actividad de AL, se encontró que todos los ensayos de coagulación eran mucho más prolongados en los del primer grupo.

Tabla 24. Perfiles de coagulación en 78 plasmas de pacientes con AL agrupados de acuerdo a la historia de trombosis, complicaciones obstétricas y LES.

	n	APTT				
		Actin FSL	Platelin LS	PTT-LA	dRVVT	TTI
TV	18	2,05 (0,78)*	2,53 (1,25)*	3,01 (1,10)#	1,80 (0,46)#	2,44 (0,95)
No trombosis	46	1,58 (0,40)	1,74 (0,59)	2,11 (0,88)	1,42 (0,50)	2,10 (1,10)
CO	13	1,60 (0,54)	1,95 (0,72)	2,53 (1,10)	1,45 (0,29)	2,90 (1,09)#
No CO	29	1,67 (0,58)	1,92 (0,93)	2,07 (0,94)	1,50 (0,59)	1,95 (0,96)
LES	17	1,47 (0,46)	1,88 (0,64)	1,90 (0,88)	1,35 (0,26)	2,65 (0,94)♦
No LES	61	1,72 (0,59)	1,92 (0,89)	2,43 (1,03)	1,55 (0,53)	1,95 (1,09)

*: $p<0,005$; #: $p<0,01$; ♦: $p<0,02$. Los resultados están expresados como se indica en la Tabla 23.

Posteriormente se realizó el análisis de acuerdo al tipo de complicación clínica de los pacientes y los resultados se presentan en la Tabla 24. Los pacientes con historia de TV se relacionaron con una prolongación más acentuada del APTT determinado con cualquiera de los reactivos y del dRVVT. Además, los pacientes con TV comparados con aquellos sin trombosis, sólo tenían mayor frecuencia de

resultados anormales de dRVVT (94,4 vs 58,7%; $p < 0,02$). Por el contrario, los perfiles de las pruebas de coagulación de los pacientes con TA no mostraron diferencias con aquellos de los pacientes sin trombosis. Dentro del grupo de mujeres con al menos un embarazo, aquellas con historia de CO sólo se asociaban con índices más altos de TTI. Por último, los pacientes con LES en comparación con aquellos LES(-), tenían mayor prolongación y una mayor frecuencia de resultados positivos del TTI (94,1 vs 59,6%; $p < 0,02$).

Discusión de los resultados de la Parte 4

La presencia de los aFL ha sido asociada a los eventos clínicos del SAF, incluyendo principalmente trombosis venosa o arterial, pérdidas fetales recurrentes y trombocitopenia.^{140,141} Sin embargo, considerando los últimos datos sobre la especificidad antigénica de estos anticuerpos es imprescindible reevaluar las asociaciones clínicas del SAF teniendo en la presencia de los anticuerpos dirigidos contra las dos principales proteínas involucradas en la reactividad de los mismos.

En el estudio retrospectivo que se realizó se encontró una fuerte asociación entre los anti- β_2 GPI de isotipo IgG y la historia de TV. Esta asociación fue confirmada en el análisis multivariado que mostró que los anti- β_2 GPI-IgG eran un factor de riesgo independiente para TV. El riesgo era aún mayor cuando se consideraban los anticuerpos de títulos moderados o fuertes. Esto es importante pues se introduce el concepto de que no solamente la presencia sino también los niveles de los anticuerpos intervienen en la definición del riesgo para los eventos clínicos. En el estudio de Viard y col.,²³³ se encontró que la historia de TV en los pacientes con LES se asociaba más con los anti- β_2 GPI que con los aCL de isotipo IgG. Esto fue confirmado también en el estudio de Cabiedes y col.²³⁸ realizado en 94 pacientes con LES. Similares conclusiones han sido presentadas en otros estudios que evaluaron pacientes con SAF primario.^{239,248} Hay solamente un estudio que presentó evidencias de la asociación de TV con los anti- β_2 GPI de isotipo IgM y no con los de isotipo IgG, pero en el estudio no se realizó análisis multivariado.²⁴⁵ En el análisis de los resultados de la tesis se encontró que la asociación fue estadísticamente significativa al considerar los aCL-IgG con niveles mayores de 20 uGPL. Esto es coincidente con los resultados del estudio prospectivo de Finazzi y col.¹⁴⁷ que demostraron una fuerte asociación entre niveles altos de aCL-IgG (>40 uGPL) y el riesgo a desarrollar TV, sin embargo, en ese estudio no se evaluaron los anticuerpos dirigidos contra β_2 GPI y protrombina. En el análisis multivariado de los datos de la tesis, los aCL-IgG y los

anti-II, que habían mostrado asociación con la historia de TV en el análisis univariado, perdieron significación como factores de riesgo independientes.

La historia de TA no se asoció con la presencia de ninguno de los aFL o anticuerpos antiproteínas evaluados. Para ambos tipos de trombosis (TV y TA) no se encontró una clara relación de estos eventos con la presencia de AL. Los datos no coinciden con lo presentado en el estudio retrospectivo recientemente publicado que concluyó que el AL es el factor de riesgo independiente más fuerte para TV y TA en pacientes con LES.¹⁴⁶ Estos autores además sugieren que los aCL, anti- β_2 GPI y anti-II no proveen información adicional sobre el riesgo de trombosis y no aconsejan la realización de los ELISAs para la detección de estos anticuerpos. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo y los de otros autores es importante continuar con la determinación de los mismos y realizar nuevos estudios prospectivos antes de sacar conclusiones definitivas. En un estudio prospectivo reciente se encontró que la presencia de niveles altos de anti-II y no de anti- β_2 GPI podían predecir un aumento en el riesgo de infarto de miocardio en hombres jóvenes con dislipidemias.²⁵⁶

Un grupo de investigadores ha propuesto recientemente la utilización del nombre *síndrome antifosfolípido/cofactor* en vez de SAF para identificar a los pacientes con complicaciones clínicas y anticuerpos aFL/antiproteínas. Además el mismo grupo postuló la existencia de una variante del síndrome que se presenta en pacientes con trombosis, resultados negativos en los ensayos para aFL pero con anticuerpos detectados en los ensayos para anti- β_2 GPI-IgG.^{238,257} Ellos sugieren que esos anticuerpos están dirigidos contra epitopes de la β_2 GPI que no son accesibles cuando la proteína está unida a la CL. Los resultados negativos para anti- β_2 GPI en esta tesis en los pacientes del grupo control con TV y aFL(-) no parecen aseverar la existencia de estos anticuerpos en una forma independiente de los aFL. Estos datos coinciden además con la evidencia presentada de que es improbable que los anticuerpos de tipo IgG que reconocen la β_2 GPI humana no reaccionen en el ensayo de aCL que utiliza β_2 GPI de origen bovino.²⁵³

En las pacientes del presente estudio las CO evaluadas en forma retrospectiva se hallaron asociadas a la presencia de anticuerpos de isotipo IgM, particularmente a los aCL y a los anti- β_2 GPI de títulos moderados y fuertes. Sin embargo, el único factor de riesgo que permanecía independiente era la presencia de los anti- β_2 GPI. Los datos de este trabajo no tienen relación con el isotipo IgG de estos anticuerpos y por lo tanto, no concuerdan con los datos publicados por Balestrieri y col.²⁴⁵ quienes encontraron que los anti- β_2 GPI-IgG se asociaban con la historia de pérdidas fetales. La diferencia puede ser debida a la evaluación de distintas poblaciones. Esto es

particularmente evidente en el estudio mencionado,²⁴⁵ en el que existía una diferencia muy significativa en la prevalencia de LES entre mujeres con y sin CO. Por el contrario, en este trabajo no se observaron diferencias en la frecuencia de LES o trombosis en los dos grupos comparados. La importancia de los aFL dependientes de β_2 GPI en la predicción del riesgo de CO fue también reportada en los estudios de Aoki y col.^{258,259} Ellos demostraron que los aCL que dependen de la β_2 GPI son más específicos que los independientes en la evaluación del riesgo obstétrico. A pesar de que estos autores evaluaron solamente el isotipo IgG y no determinaron la presencia de anticuerpos dirigidos contra β_2 GPI, los datos sugieren un rol importante de la β_2 GPI en la identificación de los anticuerpos con significación clínica. El resultado positivo fuerte en el ELISA para anti- β_2 GPI de isotipo IgM encontrado en una paciente con una historia obstétrica muy complicada y aFL(-) nos sugiere que la determinación de estos anticuerpos podría ser de utilidad en la evaluación de las pacientes con estas complicaciones clínicas. Por lo tanto, la posibilidad de detectar anticuerpos de isotipo IgM contra β_2 GPI en pacientes sin aFL está de acuerdo con los datos publicados de la preferencia de los mismos por la proteína de origen humano en comparación con la de origen bovino, la cual se utiliza en el ensayo de aCL.²⁵³

El análisis realizado de las alteraciones de los diferentes ensayos de coagulación en relación a los anticuerpos antiproteínas, reveló que la presencia de los mismos se asoció generalmente a una prolongación más marcada de los tests que se usan para el diagnóstico del AL. En el estudio de Galli y col.²⁶⁰ se sugirió que era posible distinguir entre los AL dependientes de β_2 GPI y aquellos que dependían de protrombina humana en base al distinto perfil de coagulación. Demostraron que el tiempo de coagulación con caolín se hallaba más frecuentemente alterado en los casos de AL dependientes de protrombina y el dRVVT en los AL que dependían de β_2 GPI. Otros autores demostraron que la realización del dRVVT en presencia de FL exógenos era muy sensible a los anti- β_2 GPI purificados.²⁶¹ Más recientemente, Galli y col.²⁵⁵ demostraron que el 60% de los anti-II purificados también son capaces de alterar el dRVVT en una forma similar a lo observado con los anti- β_2 GPI. Considerando estos datos se puede concluir que es difícil la diferenciación de los anticuerpos presentes en base a los resultados de los tests de coagulación. Esto coincide con nuestros hallazgos de una frecuencia similar de resultados alterados de dRVVT y de TTI en los AL asociados con la presencia de anti-II o de anti- β_2 GPI. La observación de una mayor prevalencia de un dRVVT prolongado en los pacientes con historia de TV coincidiría con la asociación ya comentada de trombosis con los anti- β_2 GPI/anti-II. Por el contrario, las CO y el LES se relacionaron principalmente con la alteración del TTI. Esto podría sugerir una mayor sensibilidad de este ensayo a la

presencia de anticuerpos antiproteínas de isotipo IgM, al utilizar tromboplastina recombinante.

Parte 5: Efecto sobre el sistema de la proteína C

Trombomodulina soluble como marcador de daño endotelial

La trombomodulina es una glicoproteína presente en la membrana de las células endoteliales que tiene un rol fundamental en la activación de la proteína C por la trombina. Se ha detectado una forma soluble de la misma que se encuentra en plasma y orina.¹⁷⁵ Esta fracción soluble de la TM es heterogénea en cuanto al tamaño y un aumento en su concentración plasmática se considera un marcador de daño endotelial.

Con el objetivo de evaluar la relación entre los aFL y el daño endotelial, se determinaron los niveles de TM soluble en un grupo de 65 pacientes con aFL (29 hombres y 36 mujeres). Inicialmente se estudiaron 72 pacientes pero se excluyeron 7 de ellos por presentar concentraciones elevadas de creatinina plasmática. Esto se debe a que la TM es depurada de la circulación principalmente por los riñones y hay reportes de un aumento importante de TM soluble en casos de disfunción renal.²⁶²

Tabla 25. Niveles plasmáticos de TM y t-PA en pacientes con aFL.

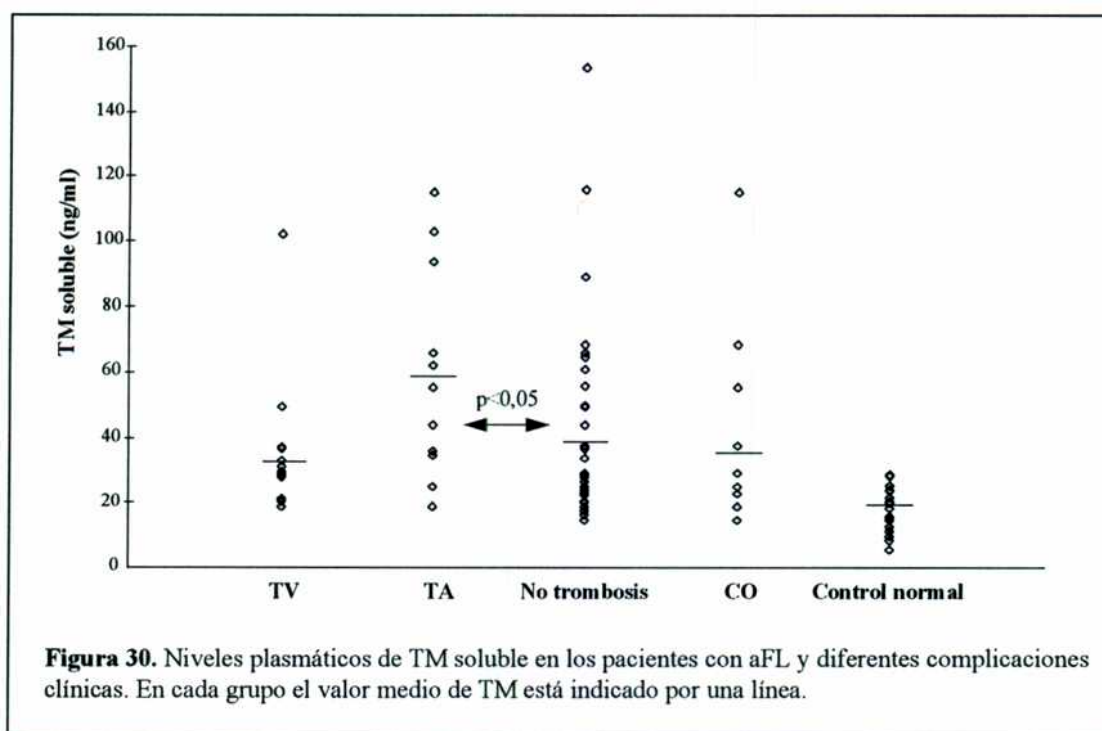
	<i>TM (ng/ml)</i>		<i>t-PA (ng/ml)</i>	
	<i>n</i>	<i>media (DE)</i>	<i>n</i>	<i>media (DE)</i>
aFL(+)	65	38,9 (30,1)*	49	7,4 (8,5)
Controles normales	21	21,0 (8,5)	17	4,2 (2,1)
<i>Especificidad</i>				
AL(+) <a>CL(+)	34	32,6 (20,4)*	25	7,7 (6,5)
AL(+) <a>CL(-)	14	43,5 (31,7)***	13	6,3 (4,3)
AL(-) <a>CL(+)	17	42,4 (31,3)**	11	6,9 (4,6)
anti- β_2 GPI(+)	21	45,4 (32,7)***	15	6,2 (4,2)
anti- β_2 GPI(-)	44	35,7 (28,6)*	34	7,8 (9,9)
<i>Asociaciones clínicas</i>				
SAF primario	35	37,6 (20,5)***	18	7,3 (5,5)
LES-aFL(+)	15	42,2 (43,7)#	11	7,8 (9,4)
LES-aFL(-)	14	22,6 (8,6)	14	9,1 (9,4)

Comparaciones respecto al grupo normal: ***p<0,005; **p<0,01; *p<0,05

LES-aFL(+) vs grupo control de LES sin aFL: # p<0,05

En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar existió un aumento muy significativo de la concentración de TM en los pacientes con aFL comparada con la hallada en los controles normales.

Cuando se evaluó la relación del aumento de TM con el tipo de aFL o la especificidad de los mismos, se encontró que todos los grupos de pacientes tenían concentraciones mayores de TM respecto a los controles normales, pero no había diferencias significativas entre ellos. En lo que concierne a las asociaciones clínicas, se encontró un aumento muy significativo en la TM plasmática tanto en los pacientes con SAF primario como secundario. Los resultados del grupo con LES y aFL se compararon con aquellos obtenidos en un grupo control de LES sin aFL, para poder analizar los datos en forma independiente de la enfermedad de base. La Tabla 25 muestra que este grupo control de LES no presenta diferencias respecto al grupo normal. Sin embargo, se observaron niveles significativamente más elevados de TM en los pacientes con LES y aFL comparados con los anteriores. De los 30 pacientes con LES, solamente 6 (2 con aFL y 4 sin aFL) cursaban un período de actividad de la enfermedad y estaban recibiendo prednisona (8mg/día) en el momento de la toma de muestra.



La evaluación en los pacientes de acuerdo al tipo de complicación clínica reveló que el aumento de TM se presentaba en todas ellas y aún en pacientes asintomáticos (Figura 30). Todos los pacientes fueron estudiados al menos 2 meses

después del evento clínico para evitar una mala interpretación de los datos provocada por las alteraciones endoteliales presentes en los procesos trombóticos agudos. Los niveles de TM (media \pm DE) en los pacientes con complicaciones clínicas fueron los siguientes: TV (n=15; 32,4 \pm 21,0 ng/ml), TA (n=11; 57,6 \pm 34,4 ng/ml), CO (n=14; 35,2 \pm 29,2 ng/ml). Para el grupo sin trombosis (n=39) los resultados fueron 36,0 \pm 30,4 ng/ml. En todos estos grupos de pacientes, con la excepción del de TA, la significación estadística alcanzada respecto al grupo control normal fue menor a 0,05. Los pacientes con TA se caracterizaron por presentar los niveles más altos de TM y la diferencia con los normales fue mayor ($p < 0,005$). El grupo de TA también tuvo niveles significativamente mayores que los pacientes sin eventos trombóticos ($p < 0,05$).

Para realizar una comparación con otro marcador de daño o activación endotelial, se evaluó la concentración plasmática de t-PA en los mismos grupos de pacientes. Como se muestra en la Tabla 25, hubo una tendencia en los pacientes con aFL de presentar mayor concentración de t-PA. Sin embargo el aumento no alcanzó significación estadística. Los mayores niveles de t-PA (media \pm DE) fueron hallados también en el grupo de TA (n=8; 10,0 \pm 5,8 ng/ml; $p < 0,001$ respecto al grupo normal).

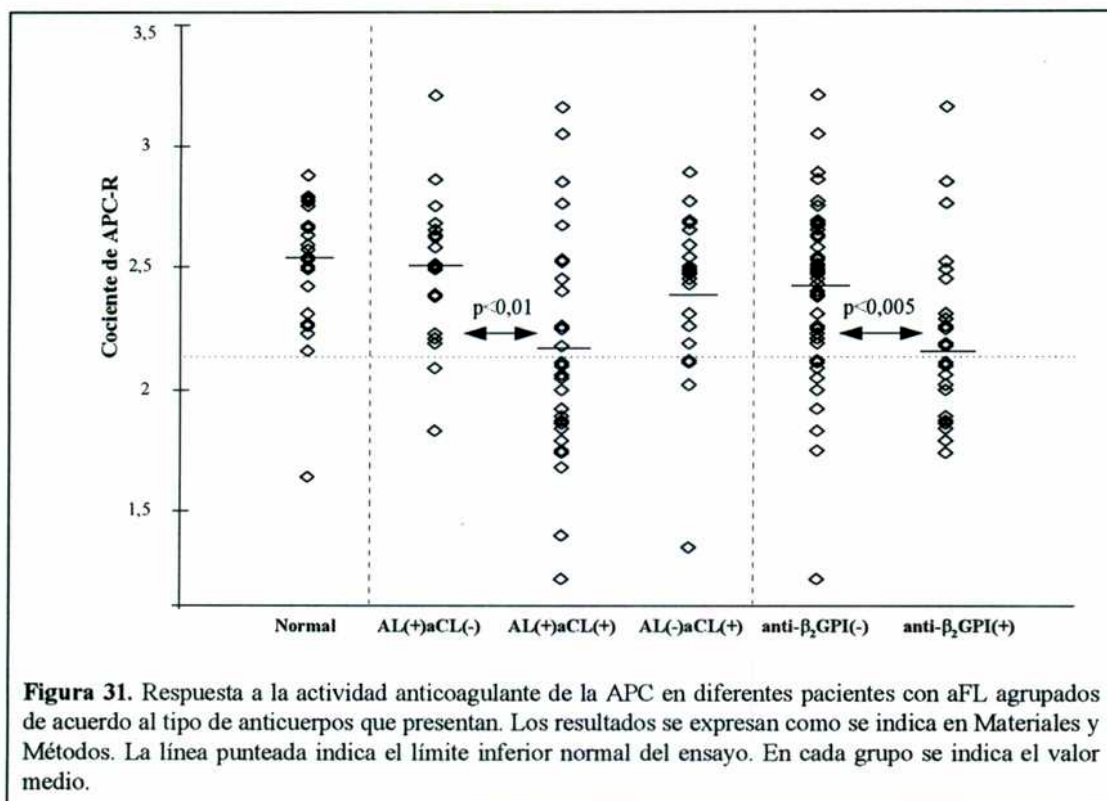
Interferencia con la actividad de la proteína C activada

Fenotipo de APC-R en los pacientes con aFL

Teniendo en cuenta los resultados de estudios previos sobre el fenómeno adquirido de resistencia a la APC,¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ se estudió el fenotipo de APC-R en los plasmas de 74 pacientes (32 hombres y 42 mujeres) con aFL. El objetivo fue evaluar si esta alteración estaba relacionada a algún aFL en particular.

El grupo total de pacientes con aFL presentó valores disminuidos del cociente de APC-R (media \pm DE) comparado al grupo control normal (2,32 \pm 0,40 vs 2,55 \pm 0,21; $p = 0,01$). En la Figura 31 se puede observar que esta diferencia parece estar relacionada a la presencia de aCL. Los pacientes con aCL y AL y aquellos con aCL sin AL tuvieron resultados más bajos (2,18 \pm 0,45 y 2,37 \pm 0,32; respectivamente) que los controles normales ($p < 0,01$ y $p < 0,05$; respectivamente). Por el contrario, los pacientes que sólo tenían AL sin aCL no tuvieron diferencias (2,50 \pm 0,31) con el grupo normal, pero sí con aquellos pacientes AL(+)/aCL(+) ($p < 0,01$).

Cuando los datos fueron analizados de acuerdo a la presencia de anti- β_2 GPI (isotipo IgG y/o IgM) se notó que la presencia de estos anticuerpos se asociaba con los cocientes más bajos de APC-R ($2,15 \pm 0,41$; $p < 0,005$ en comparación con los controles normales). Este mismo grado de significación resultó de la comparación de los anti- β_2 GPI(+) con los anti- β_2 GPI(-), ya que los pacientes con aFL sin anti- β_2 GPI tuvieron una respuesta anticoagulante a la APC ($2,42 \pm 0,35$) similar a la de los normales.



La Tabla 26 indica la frecuencia del fenotipo de APC-R en los distintos grupos de pacientes. Se consideró la presencia del fenotipo de APC-R cuando se obtuvo un valor del cociente en el ensayo para APC-R menor a 2,13. Este punto de corte fue definido como el valor medio menos dos desviaciones estándar del grupo de 22 controles sanos. En el grupo total de pacientes con aFL se encontró que este fenotipo estaba presente en aproximadamente el 30% de los casos y que esta frecuencia era significativamente mayor de la prevalencia obtenida en el grupo control (4,5%). No hubo diferencias significativas entre los pacientes con o sin actividad de AL. Sin embargo, dentro del grupo de pacientes con AL, aquellos con resultados positivos en el ELISA para aCL tenían mayor prevalencia del fenotipo de APC-R que los pacientes aCL(-) (51,5 vs 10,5%). Un hallazgo importante fue que la prevalencia del fenotipo

no fue diferente entre los controles normales y los pacientes AL(+)aCL(-). La presencia de anti- β_2 GPI se asoció con una frecuencia mucho mayor del fenotipo de APC-R que la observada en los pacientes sin estos anticuerpos (50,0 vs 17,5%). El análisis del fenotipo adquirido de APC-R de acuerdo a la historia clínica del paciente no mostró diferencias significativas entre los pacientes con TV, TA y aquellos sin historia de trombosis. Esto podría ser explicado por la evaluación de un número no demasiado grande de pacientes con trombosis.

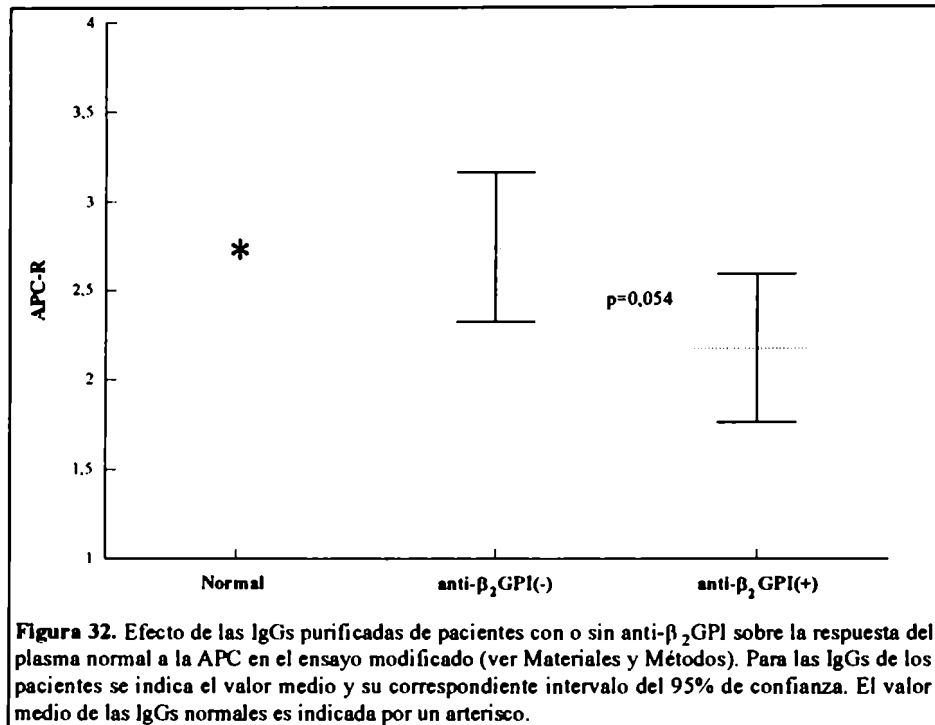
Tabla 26. Prevalencia del fenotipo de APC-R en diferentes grupos de pacientes con aFL.

	<i>Fenotipo de APC-R (n=2,13)</i>		
	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>p</i>
aFL(+)	74	31,1	<0,05
Controles normales	22	4,5	
<i>Especificidad</i>			
AL(+)	52	36,5	
AL(-)	22	18,2	
AL(+)aCL(+)	33	51,5	<0,01
AL(+)aCL(-)	19	10,5	
aCL(+)	55	38,9	<0,05
aCL(-)	19	10,5	
anti- β_2 GPI(+)	28	50,0	<0,01
anti- β_2 GPI(-)	46	17,4	
<i>Asociaciones clínicas</i>			
TV	12	41,7	ns
TA	18	33,3	ns
No trombosis	44	27,3	

Efecto de las IgGs purificadas

En los plasmas de los pacientes fue evidente que el fenotipo de APC-R era más frecuente en aquellos con anti- β_2 GPI. Por lo tanto, se decidió investigar *in vitro* si los anticuerpos purificados con distinta especificidad antigénica tenían efectos diferentes sobre la respuesta del plasma normal a la APC. Como se observa en la

Figura 32, las fracciones de IgG con especificidad para la β_2 GPI (n=11) provocaron una respuesta más deficiente en la inactivación del factor Va por parte de la APC, comparada con aquella obtenida con las IgGs purificadas de 11 pacientes anti- β_2 GPI(-) o la de 2 IgGs normales. Esta diferencia no alcanzó significación estadística (p=0,054) pero se observó una tendencia importante a obtener cocientes menores de APC-R cuando se añadían IgGs con actividad anti- β_2 GPI.



Discusión de los resultados de la Parte 5

Ha sido demostrado que la TM puede ser liberada desde las células endoteliales en cultivo en presencia de enzimas derivadas de los leucocitos polimorfonucleares.²⁶³ La acción proteolítica de la elastasa genera fragmentos de la TM con pérdida de fracciones del dominio transmembrana. Se piensa que estos fragmentos podrían ser similares a la TM soluble que se libera por el daño del endotelio *in vivo*. El aumento de la forma soluble de la TM es principalmente observado en pacientes con LES y se ha obtenido una buena correlación con la actividad de la enfermedad autoinmune, aunque no relacionada a la presencia de aFL.^{264,265} En el estudio de esta tesis se obtuvo un aumento muy significativo de la concentración de TM soluble en los pacientes con aFL comparado con los resultados del grupo normal y del grupo de LES sin aFL. Estos datos son coincidentes con lo

reportado por otros autores.²⁶⁶ El incremento de TM plasmática en los pacientes evaluados parece depender de la presencia de aFL y no de la enfermedad autoinmune de base. Sin embargo, no se encontró ninguna relación con el tipo de anticuerpo o con la especificidad antigénica de los mismos. El aumento se pudo observar tanto en pacientes con complicaciones clínicas como en aquellos asintomáticos, lo cual sugiere que el nivel de TM soluble puede considerarse como un marcador sensible del daño endotelial inducido o mediado por los aFL. El hallazgo de los mayores niveles de TM en los pacientes con historia de TA está de acuerdo con los datos presentados en un estudio realizado en pacientes con enfermedad aterosclerótica.²⁶⁷ La TM tiene una función crucial en el sistema antitrombótico de la PrC y por lo tanto la alteración cuali o cuantitativa de la TM presente en el endotelio podría tener un rol en la patogenia del SAF.

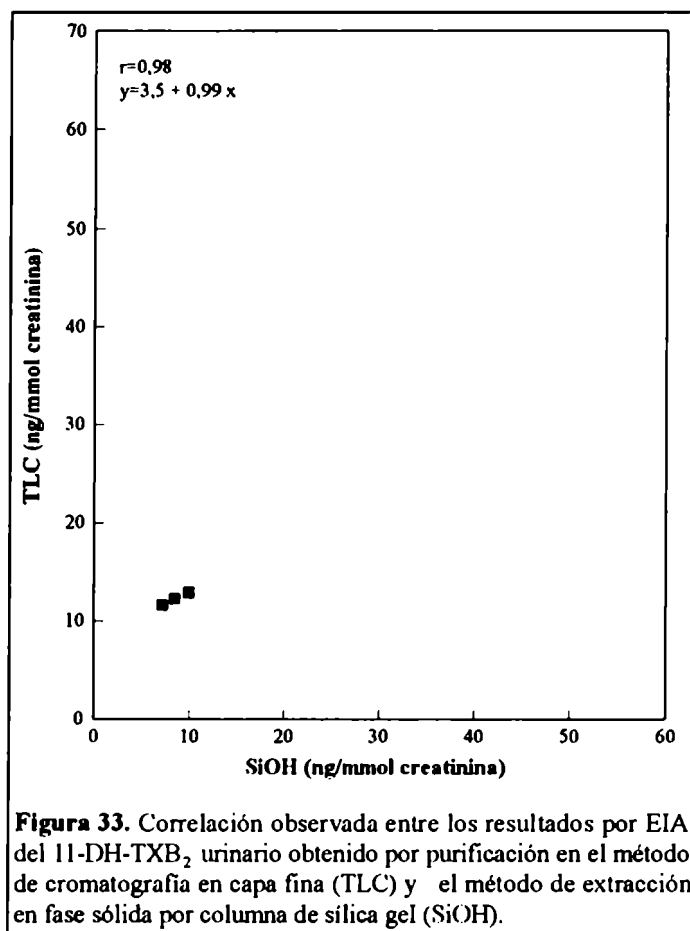
En los últimos dos años se han publicado algunos estudios que muestran el hallazgo de una alta frecuencia del fenómeno de APC-R en forma adquirida en pacientes con aFL.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Se encontró tanto en pacientes con LES como en aquellos con SAF primario. Los estudios iniciales fueron realizados principalmente en pacientes con AL y se reportó la influencia del mismo en el ensayo utilizado para el diagnóstico de la APC-R.²⁶⁸ Una de las hipótesis propuestas para explicar la respuesta defectuosa a la APC es la interferencia de los aFL en el ensamble del factor V o factor Va con las superficies fosfolipídicas, con la consecuente protección del factor Va de la degradación. Recientemente se ha demostrado que la β_2 GPI tiene un rol modulador de la actividad de la APC y se postuló que los aFL podrían potenciar su efecto inhibitorio.⁷⁸ El grupo de Matsuda y col. mostró que los anticuerpos de conejo anti- β_2 GPI ejercían un efecto inhibitorio sobre la inactivación del factor Va por la APC cuando se ensayaban en un sistema purificado²⁶⁹ o en plasma utilizando el test basado en el APTT.²⁷⁰ Sin embargo, no hay hasta el momento reportes de un efecto similar por parte de los anti- β_2 GPI generados en humanos. Los resultados del presente trabajo mostraron que los aFL se asociaban con una frecuencia muy alta de APC-R y que este efecto no se relacionaba con los anticuerpos con actividad de AL sin la presencia concomitante de anticuerpos antiproteínas o aCL. Por el contrario, la prevalencia del fenotipo de APC-R fue mucho mayor en los pacientes que tenían anticuerpos dirigidos contra la β_2 GPI. Más aún, los experimentos *in vitro* con IgGs purificadas en el ensayo del APTT modificado²⁷¹ mostraron que aquellas con especificidad para la β_2 GPI producían un efecto inhibitorio más pronunciado en la inactivación del factor Va por la APC. Bokarewa y col.¹⁸⁸ reportaron que los pacientes con historia de trombosis y/o abortos recurrentes que presentaban una actividad fuerte de AL tenían una frecuencia muy alta (60%) de APC-R por el ensayo

de coagulación y una mucha menor (14%) de la mutación del factor V. Los datos de la Parte 4 de Resultados mostraron que los AL que presentaban las mayores prolongaciones en los tests de coagulación eran aquellos que se asociaban a la presencia de anticuerpos antiproteínas. Por lo tanto, podría ser que los resultados observados por Bokarewa en los AL fuertes se deban a la presencia concomitante de anti- β_2 GPI, aunque en ese estudio no se evaluó la especificidad de estos anticuerpos. Estos datos sugieren que los anticuerpos antiproteínas, especialmente los anti- β_2 GPI, serían los responsables del fenómeno adquirido de APC-R que se observa en pacientes con aFL. El rol *in vivo* de los anti- β_2 GPI no se conoce pero considerando su fuerte asociación con las complicaciones tromboembólicas venosas es posible asumir que la interferencia en la vía de la PrC podría representar uno de los mecanismos patogénicos del SAF.

Parte 6: Autoanticuerpos y metabolitos urinarios del TXA₂

Estandarización del método rápido para la purificación del 11-DH-TXB₂

Uno de los primeros objetivos de esta parte fue tratar de estandarizar un método rápido para la purificación de metabolitos urinarios de eicosanoides que sirviera como sustituto de la técnica de cromatografía en capa fina (TLC).²²⁸ Esta última tiene la desventaja de ser una metodología que demanda un tiempo prolongado de procesamiento y de purificar un número limitado de muestras en forma simultánea.



Se eligieron 30 sujetos normales, de acuerdo a las normas establecidas,^{222bis} y se prepararon tres pools con las orinas de 10 personas cada uno. Con las orinas de los mismos individuos después de la ingestión de una dosis única de 500 mg de ácido acetilsalicílico (ASA) se prepararon de la misma forma otros tres pools. De esta manera se dispuso de tres pools de orinas normales y de tres pools de orinas con ASA. En cada uno de ellos se determinó la concentración de 11-DH-TXB₂

purificados por el método de TLC y el de silica gel (SiOH). Los valores de 11-DH-TXB₂ en ambos pools fueron similares utilizando las dos técnicas de purificación. Los niveles (ng/mmol creatinina) por el método de TLC fueron 45,8 ± 6,8 (pool normal) y 12,6 ± 0,9 (pool ASA), mientras que por el método de SiOH se obtuvieron los siguientes valores 42,7 ± 3,8 (pool normal) y 8,6 ± 4,4 (pool ASA). Como se observa en la Figura 33 se obtuvo una excelente correlación (r=0,98; p<0,0001) entre los valores registrados por las dos técnicas. La correspondiente ecuación de regresión se presenta también en la Figura 33. La recuperación del metabolito 11-DH-TXB₂ de las muestras de orina, estimada por la recuperación del TXB₂ radioactivo añadido, fue mejor con el método de SiOH (64,3 ± 10,8%) que con el de TLC (34,2 ± 5,7%). La reproducibilidad de la técnica de SiOH se determinó repitiendo el proceso de purificación en tres alícuotas de orinas de controles normales y en seis de pacientes con aFL. La variabilidad interensayo fue de 3,0 a 15,4% y la intraensayo de 2,9 a 10,4%. El rango normal de concentración del 11-DH-TXB₂ urinario fue determinado en 18 controles sanos por el método de SiOH. El valor de la mediana fue de 42,4 ng/mmol creatinina y el rango intercuartilo de 32 a 61 ng/mmol creatinina. Este rango de valores normales es muy similar al previamente reportado para el método de purificación de TLC.^{167,228}

Excreción urinaria de 11-DH-TXB₂ en pacientes con aFL

Relación con las complicaciones clínicas

La excreción urinaria de 11-DH-TXB₂ en los 34 pacientes con aFL fue significativamente mayor que la observada en el grupo normal (Tabla 27). Además se encontró que el 71% de los pacientes con aFL presentaban concentraciones de 11-DH-TXB₂ por encima del límite superior normal. En la Figura 34 se muestra la distribución de los resultados en ambos grupos (normales y pacientes con aFL).

La comparación entre los grupos de pacientes con o sin SAF y de normales demostró que no había diferencias significativas por el test de ANOVA de Kruskal-Wallis. Por el contrario, ésta se evidenció al comparar la excreción urinaria de 11-DH-TXB₂ entre los grupos de controles normales y pacientes con o sin historia de trombosis (Tabla 27). El análisis posterior demostró que los pacientes con trombosis presentaban valores significativamente más elevados que el grupo normal (p=0,01). No se observaron diferencias significativas entre el grupo normal y el de pacientes sin trombosis, ni entre los grupos con o sin trombosis.

Tabla 27. Niveles de 11-DH-TXB₂ urinario en diferentes grupos de pacientes.

Grupo	n	11-DH-TXB ₂ (ng/mmol creatinina)		ANOVA	
		Mediana	Rango intercuartilo	p (grupos)	p
1. Normal	18	42,4	32-61		
2. aFL(+)	34	119,8	69-221	<0,01*	
3a. SAF(+)	19	145,0	65-221	ns**	
3b. SAF(-)	15	118,5	69-227		
4a. Trombosis(+)	12	185,0	96-258	0,01***	0,01 #
4b. Trombosis(-)	22	110,3	64-163		ns ##

*(1 vs 2), **(1 vs 3a vs 3b), ***(1 vs 4a vs 4b), #(1 vs 4a), ##(1 ó 4a vs 4b)

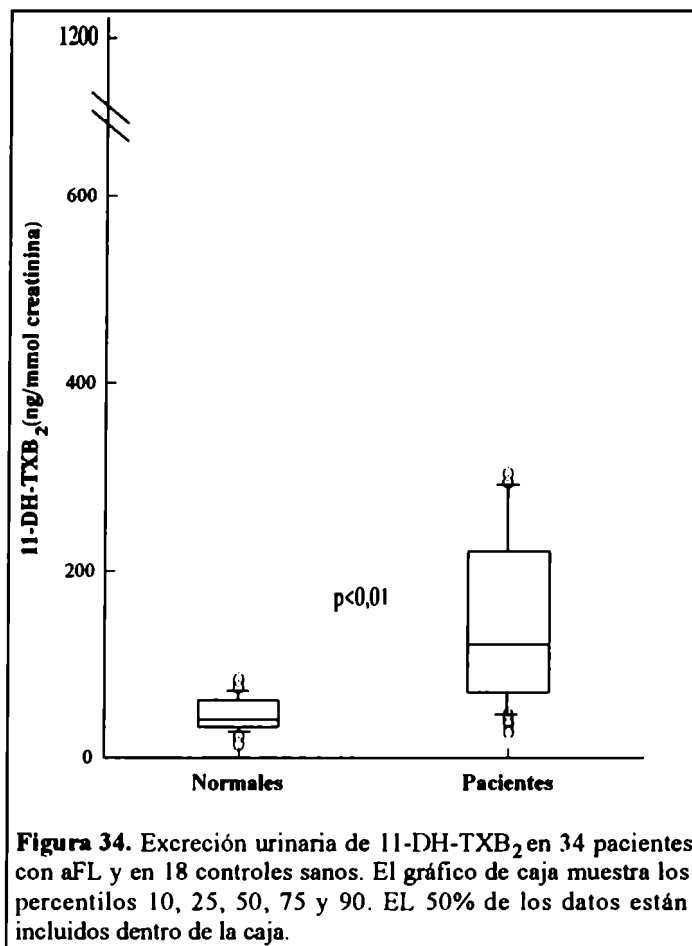


Figura 34. Excreción urinaria de 11-DH-TXB₂ en 34 pacientes con aFL y en 18 controles sanos. El gráfico de caja muestra los percentilos 10, 25, 50, 75 y 90. EL 50% de los datos están incluidos dentro de la caja.

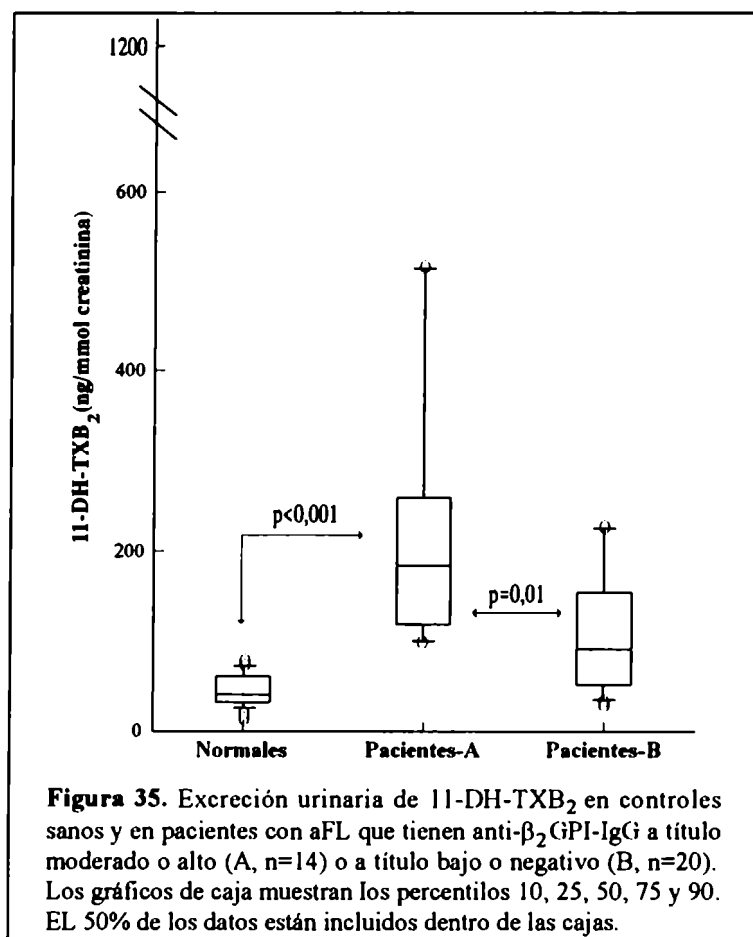
Asociación con la especificidad antigénica

En la Tabla 28 se presentan los resultados hallados de la excreción urinaria de 11-DH-TXB₂ analizados teniendo en cuenta el tipo de aFL o las especificidad antigénica de los mismos. Se puede observar que no hay diferencias entre los grupos de pacientes con o sin AL comparados con el grupo normal. Tampoco hay diferencias cuando se analizan los pacientes agrupados según la presencia de aCL de isotipo IgG o IgM. Los pacientes con anti-II fueron analizados sin considerar el isotipo de inmunoglobulina por el número escaso de pacientes con estos anticuerpos. No hubo asociación entre los niveles de 11-DH-TXB₂ y la positividad de anti-II o la de anti-β₂GPI de isotipo IgM.

Tabla 28. Niveles de 11-DH-TXB₂ urinario en los pacientes agrupados de acuerdo a la especificidad antigénica de los aFL. Los anticuerpos por ELISA fueron considerados positivos cuando eran de título moderado o fuerte.

Grupo	n	11-DH-TXB ₂ (ng/mmol creatinina)		ANOVA	
		Mediana	Rango intercuartilo	p (grupos)	p
1. Normal	18	42,4	32-61		
2a. AL(+)	26	133,0	90-211	ns (1 vs 2a vs 2b)	
2b. AL(-)	8	91,7	46-227		
3a. aCL-IgG(+)	21	153,7	65-227	ns (1 vs 3a vs 3b)	
3b. aCL-IgG(-)	13	104,3	67-165		
4a. aCL-IgM(+)	11	104,3	43-158	ns (1 vs 4a vs 4b)	
4b. aCL-IgM(-)	23	159,0	90-228		
5a. anti-β ₂ GPI-IgG(+)	14	186,5	119-258	<0,001 (1 vs 5a vs 5b)	<0,001 (1 vs 5a)
5b. anti-β ₂ GPI-IgG(-)	20	96,0	51-154		0,01 (5a vs 5b)
					ns (1 vs 5b)
6a. anti-β ₂ GPI-IgM(+)	11	145,0	73-210	ns (1 vs 6a vs 6b)	
6b. anti-β ₂ GPI-IgM(-)	23	118,5	71-218		
7a. anti-II(+)	6	133,0	67-224	ns (1 vs 7a vs 7b)	
7b. anti-II(-)	28	110,3	90-171		

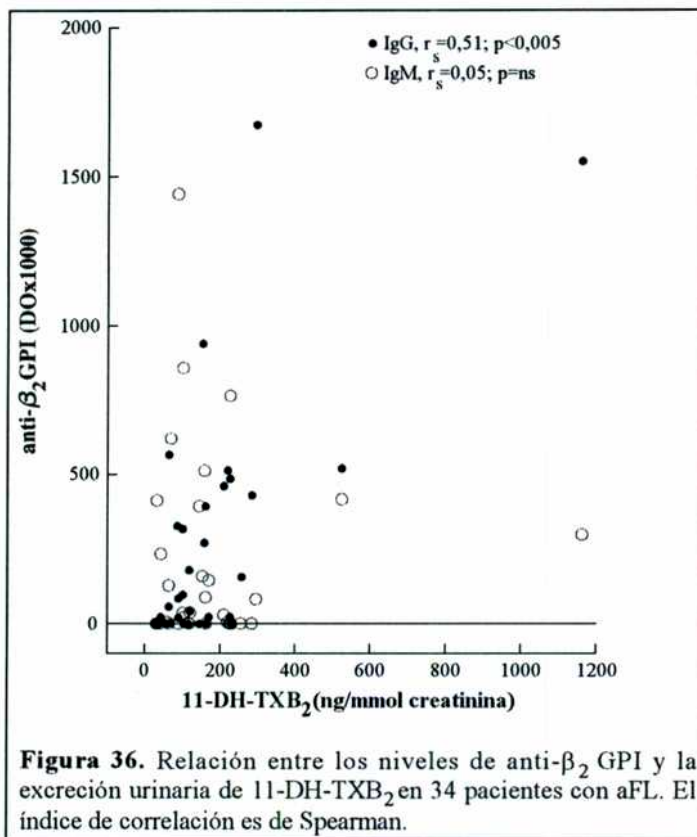
Sin embargo, una diferencia muy significativa fue observada al comparar los pacientes con o sin anti- β_2 GPI de isotipo IgG y el grupo normal. Las comparaciones posteriores demostraron que la diferencia se debía principalmente a los elevados niveles de 11-DH-TXB₂ encontrados en los pacientes con anti- β_2 GPI-IgG a título moderado o alto (grupo A) comparados con los controles normales (Figura 35). La diferencia no fue significativa cuando el grupo normal se comparó con los pacientes con anti- β_2 GPI-IgG a título bajo o negativo (grupo B). Además, el grupo A fue estadísticamente diferente del grupo B. Es importante remarcar que los 14 pacientes con anti- β_2 GPI-IgG a título moderado o alto tuvieron niveles en orina de 11-DH-TXB₂ por encima del límite superior normal.



Correlación entre 11-DH-TXB₂ y especificidad de los aFL

El análisis de la correlación entre los niveles urinarios de 11-DH-TXB₂ y los títulos de los diferentes anticuerpos por ELISA mostró que existía una buena correlación cuando se consideraban los anti- β_2 GPI de isotipo IgG (Figura 36). La

correlación por el rango de Spearman fue de 0,51 ($p < 0,005$). Esta se mantenía aún cuando en el análisis se excluía al paciente con los datos más extremos ($r_s = 0,45$; $p < 0,05$).



Por el contrario, no hubo correlación cuando se consideraron los anti- β_2 GPI de isotipo IgM (Figura 36). Tampoco se halló relación entre los niveles de 11-DH-TXB₂ y los aCL-IgG ($r_s = 0,30$), aCL-IgM ($r_s = 0,08$), anti-II-IgG ($r_s = -0,06$) o anti-II-IgM ($r_s = 0,01$).

Discusión de los resultados de la Parte 6

El efecto de los aFL sobre la generación de eicosanoides por distintos tipos celulares es uno de los mecanismos propuestos para explicar el rol patogénico de los aFL. En estudios previos se ha observado que los aFL inducen la activación de las plaquetas y la formación de tromboxano.^{169,170} Este efecto fue solamente observado cuando en las experiencias se utilizaban IgGs de pacientes con SAF y no con aquellas purificadas de sujetos con sífilis.¹⁷² En un estudio se demostró que los aFL eran los responsables directos de la activación plaquetaria en experiencias en las cuales se

usaban plaquetas humanas filtradas y aCL generados en conejos y purificados por afinidad.¹⁶⁹ Los resultados de esos estudios son compatibles con el aumento observado *in vivo* de los metabolitos urinarios del tromboxano de origen plaquetario.^{167,168} Sin embargo, no se encontró correlación directa entre los niveles urinarios del 11-DH-TXB₂ o del 2,3-dinor-TXB₂ y los títulos de los aCL o la prolongación del APTT (considerada como un índice de la actividad del AL).

Generalmente, los metabolitos urinarios de los eicosanoides han sido purificados por cromatografía gaseosa y medidos por espectrometría de masa,¹⁶⁸ o purificados por TLC y determinados por métodos de EIA usando anticuerpos específicos.^{167,272} En algunos casos se han utilizado también métodos de radioinmunoanálisis. La purificación de los metabolitos urinarios es la etapa limitante en estos estudios y las técnicas publicadas sólo permiten el análisis simultáneo de un número limitado de muestras. Por ese motivo el objetivo fue desarrollar un método más simple y rápido para la extracción de los metabolitos. La combinación de cromatografía en columna de SiOH y medición por EIA demostró ser una metodología con la misma sensibilidad y reproducibilidad que el método que combina TLC/EIA para la medición del 11-DH-TXB₂.

Al aplicar esta nueva metodología en la evaluación de la biosíntesis de tromboxano de los pacientes con aFL se confirmó la falta de correlación entre los niveles aumentados del 11-DH-TXB₂ y la presencia de AL o los títulos de aCL, tanto para el isotipo IgG como para el IgM. Sin embargo, considerando que los aFL representan una familia muy heterogénea de anticuerpos con diferentes especificidades, la ausencia de correlación hallada cuando se evaluaron solamente los resultados de los ensayos convencionales para aFL llevó a investigar la asociación entre la excreción del 11-DH-TXB₂ y los anticuerpos antiproteínas. Los anticuerpos con especificidad por la protrombina no se asociaron con la excreción urinaria del 11-DH-TXB₂, así como tampoco los anti-β₂GPI de isotipo IgM. Por el contrario, se encontró que los títulos de los anti-β₂GPI de isotipo IgG se correlacionaron con los niveles de este metabolito urinario del tromboxano plaquetario. Además, las concentraciones más altas del 11-DH-TXB₂ se observaron en el grupo de pacientes que tenían anti-β₂GPI-IgG a títulos moderados o fuertes. Estos datos sugieren que la activación plaquetaria *in vivo* observada en los pacientes con aFL estaría relacionada con la presencia de anticuerpos específicos para la β₂GPI humana. Esto coincidiría con la evidencia experimental presentada por Arvieux y col.²⁷³ del efecto directo de los anticuerpos monoclonales de ratón contra β₂GPI humana generando activación y secreción plaquetaria sólo en la presencia del cofactor proteico. Además, observaron que el efecto requería la presencia de los fragmentos Fab y Fc de los anticuerpos y

sugirieron que el receptor Fc γ presente en la superficie plaquetaria tendría un rol importante en la acción de los anti- β_2 GPI. Arnout²⁷⁴ recientemente propuso la hipótesis de la activación celular mediada por el receptor Fc γ como un mecanismo importante en la patogénesis del SAF, haciendo un paralelismo con el mecanismo de trombosis en la trombocitopenia inducida por heparina. La hipótesis sugiere que luego de la exposición de los FL aniónicos por el daño inicial de las membranas celulares se unirían las proteínas que unen FL, como la β_2 GPI, y después los anticuerpos reaccionarían con las proteínas unidas a los FL. Estas inmunoglobulinas concentradas en la superficie celular podrían unirse al receptor Fc γ a través del fragmento Fc de la IgG, activar las plaquetas y de este modo facilitar la promoción de trombosis. Los datos de la tesis corroboran la existencia de activación plaquetaria *in vivo* asociada a la presencia de anti- β_2 GPI-IgG y retrospectivamente a la presencia de eventos trombóticos.

CONCLUSIONES

Los aFL son una familia de inmunoglobulinas que se caracterizan históricamente por ser detectados mediante el uso de tests que emplean FL.¹²⁸ La asociación de estos anticuerpos con eventos trombóticos venosos o arteriales, pérdidas fetales recurrentes o trombocitopenia definen al SAF. En los últimos años ha sido cuestionada e investigada la verdadera especificidad antigénica de los aFL y los nuevos conceptos fueron recientemente revisados.^{121,275-277} En particular, desde el año 1990 se presentaron evidencias de que los aCL no estarían dirigidos contra la molécula del FL sino más bien contra el complejo formado por la CL y la β_2 GPI. Además, los anticuerpos responsables de la actividad de AL parecen estar relacionados a inmunoglobulinas que reaccionan con los complejos que forman los FL aniónicos con la protrombina o la β_2 GPI. En algunos pacientes con SAF también se hallaron anticuerpos dirigidos contra otras proteínas que unen FL, como la PrC o la PrS, los cuales no son detectados en los ensayos convencionales de aFL. Más recientemente, se presentaron datos experimentales de la existencia de anticuerpos que reaccionan directamente con las proteínas mencionadas anteriormente. A pesar de esta evidencia, hay algunos investigadores que no están de acuerdo con estos hallazgos y consideran que los aFL son primariamente anticuerpos que reaccionan con epitopes fosfolipídicos expresados como consecuencia de la unión a ciertos cofactores proteicos.

A continuación se analizan los objetivos propuestos en esta tesis y las conclusiones generales a las que se arribaron con los resultados obtenidos.

Parte 1: Se mostraron los datos experimentales que permitieron optimizar las condiciones para desarrollar los ELISAs para la identificación de anticuerpos antiproteínas. *La necesidad de una superficie especial fue el común denominador para poder detectar anti- β_2 GPI y anti-II en la ausencia de FL.* Esto permite explicar en parte el hecho de que algunos investigadores no han podido hallar estos anticuerpos en pacientes con aFL. Hasta el momento, dos hipótesis han sido presentadas para entender la interacción *in vitro* de los aCL con la β_2 GPI. Una de ellas propone que *los aCL reconocen un neoepitope en la molécula de la β_2 GPI expuesto como consecuencia del cambio conformacional sufrido por la proteína al unirse con los FL o a superficies plásticas polioxigenadas por la irradiación.* La otra sugiere que *los aCL son de baja afinidad y reaccionan con la β_2 GPI solamente si ésta se presenta en placas irradiadas que permiten aumentar la concentración antigénica o sobre superficies fosfolipídicas.* Algunos resultados presentados en este trabajo nos sugieren que los anticuerpos antiproteínas parecen reaccionar de acuerdo

a la primera hipótesis. Sin embargo, la existencia de anticuerpos de baja afinidad no puede ser excluida al considerar los resultados positivos para anti- β_2 GPI y anti-II obtenidos en los ensayos de inmunoblotting.

Parte 2: Se presentan los datos que demuestran que los anti- β_2 GPI y los anti-II son frecuentemente encontrados en pacientes con aFL. *Los anti- β_2 GPI se correlacionan muy bien con los aCL, lo que sugiere que se tratarían de los mismos anticuerpos detectados en dos ensayos distintos o de dos anticuerpos diferentes pero relacionados entre sí.* Los pacientes que presentan positividad en los ELISAs de anti- β_2 GPI y anti-II pertenecen mayoritariamente al grupo autoinmune (SAF y/o LES). *El ensayo de anti- β_2 GPI permitió diferenciar claramente a los aCL presentes en los pacientes con SAF (autoanticuerpos) de aquellos que se detectan en pacientes con infecciones como la sífilis (alloanticuerpos).* Los anti- β_2 GPI y los anti-II son menos frecuentemente hallados y a títulos más bajos en los pacientes con aFL sin evidencia de complicaciones clínicas, al igual que en los pacientes con HIV. Los resultados en los ensayos modificados para aCL demuestran un *perfil diferente de reactividad de los anticuerpos asociados al SAF (dependientes de β_2 GPI) y de aquellos relacionados a sífilis (independientes de β_2 GPI).*

Parte 3: Se pudo confirmar la diferente especificidad antigénica de los auto y alloanticuerpos empleando IgGs purificadas de pacientes con SAF o con sífilis. En los ELISAs modificados se encontró que *las IgGs de sífilis reaccionan específicamente con la CL y esta interacción es fuertemente inhibida cuando la CL se presenta en la placa unida a la β_2 GPI.* La adsorción de los anticuerpos mediante el uso de liposomas de CL confirma esta reactividad. Por el contrario, *la mayoría de las IgGs purificadas de pacientes con SAF reaccionan específicamente con la β_2 GPI adsorbida en placas irradiadas y no lo hacen con la CL en ausencia del cofactor proteico.* Los experimentos de adsorción con liposomas de CL preparados en presencia de β_2 GPI confirmaron que estas IgGs tienen especificidad contra la proteína unida a FL. Por el contrario, no se obtuvo inhibición cuando se utilizó liposomas de CL en ausencia del cofactor o empleando altas concentraciones de β_2 GPI soluble. Esto indica que *los autoanticuerpos reconocen a la β_2 GPI solamente cuando se presenta en una determinada conformación estructural.* Se encontró que *algunas IgGs de pacientes con AL reconocían específicamente a la protrombina humana en la ausencia de FL.* A pesar de esto, en algunos pocos casos hallamos que las IgGs reaccionaban específicamente con la CL, lo cual enfatiza la heterogeneidad que caracteriza a los aFL.

Parte 4: Retrospectivamente se evaluaron las asociaciones entre las manifestaciones clínicas y la presencia de distintos tipos de aFL y se encontró que *los anti- β_2 GPI de isotipo IgG representaban un factor de riesgo independiente para TV. Este riesgo se incrementaba cuando sólo se consideraba a los anti- β_2 GPI de títulos moderados o fuertes*. Los anticuerpos con actividad de AL, los aCL o los anti-II presentaban en algunos casos asociación con TV pero no constituían factores de riesgo independientes. La historia de TA no se asoció particularmente con ninguno de los anticuerpos de la familia de los aFL. *En la evaluación de las mujeres con CO se observó que hubo una clara asociación de éstas con los anticuerpos de isotipo IgM (aCL y anti- β_2 GPI). No obstante sólo los anti- β_2 GPI-IgM de títulos moderados o fuertes permanecían como factores de riesgo independientes*. La posibilidad de obtener resultados positivos en los ELISAs para anticuerpos antiproteínas en pacientes sin aFL y con complicaciones clínicas es muy baja. Sin embargo, sería útil su determinación (especialmente anti- β_2 GPI-IgM) en mujeres con una historia obstétrica muy mala. El análisis de los tests de coagulación para AL en relación al tipo de anticuerpos detectados por ensayos de ELISAs demostró que en general *los pacientes que presentan resultados positivos por ELISA tienen las mayores prolongaciones en las pruebas de coagulación*. Los datos de este trabajo no permitieron asociar la alteración de un determinado test de coagulación con la presencia particular de algún tipo de anticuerpo antiproteína.

Parte 5: Se estudió la acción de los aFL sobre algunos componentes del sistema de la PrC. Se encontró que en la mayoría de *los pacientes con aFL (SAF o asintomáticos) hay un aumento muy significativo en la concentración de TM soluble*. Esto indica que el daño endotelial es una característica de los pacientes con estos anticuerpos y es independiente de la especificidad de los mismos. En lo que respecta a la interferencia de los anticuerpos con la actividad de la APC, se encontró que *los anticuerpos que inducen la resistencia a la APC in vitro son primariamente aquellos que tienen especificidad por la β_2 GPI*. Los pacientes con anti- β_2 GPI presentan una mayor frecuencia del fenotipo de APC-R que los pacientes con aFL sin anticuerpos específicos para esta proteína. El agregado de IgGs purificadas con reactividad contra la β_2 GPI al plasma normal provocó una respuesta defectuosa al agregado de APC en comparación con las IgGs anti- β_2 GPI(-). Esto sugeriría que *la inhibición del sistema antitrombótico de la PrC, propuesto como uno de los mecanismos patogénicos del SAF, se debería a un efecto de los anticuerpos específicos para la β_2 GPI*.

Parte 6: Se muestran los datos de la validación de un nuevo método para la purificación de los metabolitos urinarios de los eicosanoides. *El método simple y rápido de cromatografía en columna de SiOH y posterior dosaje por EIA demostró ser tan útil como el de TLC/EIA.* La aplicación de esta nueva metodología confirmó *el aumento de la excreción urinaria del principal metabolito del tromboxano plaquetario (11-DH-TXB₂) en los pacientes con aFL. Sin embargo, este aumento se encontró principalmente en los pacientes con altos títulos de anticuerpos de isotipo IgG específicos para la β_2 GPI.* La hipótesis de la activación plaquetaria por los aFL que reaccionan con la β_2 GPI unida a los FL de la membrana celular podría explicar en parte el rol patogénico de los anti- β_2 GPI en el desarrollo de las complicaciones trombóticas presentes en estos pacientes. Además permitiría explicar el hallazgo de otros autores que demostraron activación plaquetaria inducida por acción de las IgGs de pacientes con SAF y no por las de pacientes con sífilis que tienen diferente especificidad antigénica.

Conclusión general: Los datos de este trabajo de tesis permiten concluir que *la mayoría de los aFL presentes en pacientes con SAF o enfermedades autoinmunes muestran una clara reactividad con proteínas plasmáticas que unen fosfolípidos y están particularmente dirigidos contra la β_2 GPI y la protrombina humana. Por el contrario, los anticuerpos con especificidad por los FL se presentan mayoritariamente en pacientes con aFL sin complicaciones clínicas relacionadas al SAF o en aquellos con infecciones. Por lo tanto, la incorporación de ensayos que permiten evaluar la presencia de anticuerpos contra determinadas proteínas dentro del panel de los ensayos clásicos para los aFL parece ser de gran utilidad diagnóstica. Las proteínas involucradas en la especificidad de los aFL intervienen en varios mecanismos hemostáticos importantes y la hipótesis de la interferencia de los autoanticuerpos en sus funciones podría explicar, al menos en parte, la fisiopatología del SAF.*

**PUBLICACIONES DEL
TRABAJO DE TESIS**

1. Martinuzzo M, Forastiero R, Carreras LO. Anti β_2 glycoprotein I: detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995, 89: 397-402.
2. Carreras LO, Forastiero RR. Cofactores de los anticuerpos antifosfolípidos. Rol patogénico de los anticuerpos anti β_2 glicoproteína I. *Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia* 1995, 8: 59-60.
3. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO. Diagnostic des anticoagulants circulants de type lupique. *Hématologie* 1996, 3: 211-6.
4. Carreras L, Forastiero R, Falcón C, Maclouf J. Syndrome des antiphospholipides: de la reconnaissance des phospholipides à celle des "antiphospholipides-protéines". *Hématologie* 1996, 3: 203-10.
5. 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.
6. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO. Increased plasma thrombomodulin in different subgroups of patients with antiphospholipid and anti β_2 glycoprotein I antibodies. *Thromb Haemost* 1996, 75: 972-3.
7. Carreras LO, Forastiero RR. Pathogenic role of antiprotein-phospholipid antibodies. *Haemostasis* 1996, 26: 340-57.
8. Martinuzzo M, Forastiero R, Adamczuk Y, Cerrato G, Carreras LO. Activated protein C resistance in patients with anti β_2 glycoprotein I antibodies. *Blood Coag Fibrinol* 1996, 7: 702-4.
9. 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 (sometido a publicación).
10. Falcon CR, Martinuzzo ME, Forastiero RR, Cerrato GS, Carreras LO. Pregnancy loss and autoantibodies against phospholipid-binding proteins. *Obstet Gynecol* 1997 (en prensa).
11. Forastiero R, Martinuzzo M, Carreras LO, Maclouf J. Anti- β_2 glycoprotein I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid antibodies: association with increased excretion of platelet-derived thromboxane urinary metabolites (sometido a publicación).

**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

1. Davie EW. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb Haemost* 1995, 74: 1-6.
2. Sunnerhagen M, Forsén S, Hoffrén AM, Drakenberg T, Teleman O, Stenflo J. Structure of the Ca²⁺-free Gla domain sheds light on membrane binding of the blood coagulation proteins. *Nature Structural Biology* 1995, 2: 504-9.
3. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus* 1996, 5: 480-7.
4. Guillin MC, Bezeaud A, Bouton MC, Jandrot-Perrus M. Thrombin specificity. *Thromb Haemost* 1995, 74: 129-33.
5. Wasserman A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Deutsch Med Wschr* 1906, 32: 745-6.
6. Catterall RD. Biological false positive reactions and systemic disease. In Walker G (ed). *Ninth Symposium on Advanced medicine*. London: Pitman Medical 1973: 97-111.
7. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941, 48: 484-6.
8. Harris A, Rosenberg AA, Riedel L. A microfloculation test for syphilis using cardiolipin antigen. Preliminary report. *J Vener Dis Inf* 1946, 27: 169-74.
9. Moore JE, Mohr CF. Biologically false positive serologic tests for syphilis: type, incidence, and cause. *JAMA* 1952, 150: 467-73.
10. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952, 31: 621-2.
11. Frick PG. Acquired circulating anticoagulants in systemic collagen diseases. Autoimmune thromboplastin deficiency. *Blood* 1955, 10: 691-706.
12. Laurell AB, Nilsson IM. Hypergammaglobulinemia, circulating anticoagulant, and biologic false positive Wasserman reaction: a study of two cases. *J Lab Clin Med* 1957, 49: 694-707.
13. Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb* 1972, 1: 75-95.
14. Derksen RHW, Kater L. Lupus anticoagulant: revival of an old phenomenon. *Clin Exp Rheumatol* 1985, 3: 349-57.
15. Colaco CB, Male DK. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol* 1985, 59: 449-56.

16. Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med* 1980, 92: 156-9.
17. Canoso RT, Hutton RA, Deykin DA. Chlorpromazine-induced inhibitor of blood coagulation. *Am J Hematol* 1977, 2: 183-91.
18. Boxer M, Ellman L, Carvalho A. The lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 1976, 19: 1244-8
19. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. *Ann Intern Med* 1990, 112: 682-98.
20. Margolius A, Jackson DP, Ratnoff OD. Circulating anticoagulants: a study of 40 cases and a review of the literature. *Medicine* 1961, 40: 145-202.
21. Shaulian E, Shoenfeld Y, Berliner S, Shaklai M, Pinkhas J. Surgery in patients with circulating lupus anticoagulants. *Int Surg* 1981, 66: 157-9.
22. Schleider MA, Nachman RL, Jaffe EA, Coleman M. A clinical study of the lupus anticoagulant. *Blood* 1976, 48: 499-509.
23. Shapiro SS, Thiagarajan P. Lupus anticoagulants. *Prog Hemost Thromb* 1982, 6: 263-86.
24. Bowie EJW, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med* 1963, 62: 416-30.
25. Lechner K. Acquired inhibitors in nonhemophilic patients. *Haemostasis* 1974, 3: 65-93.
26. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GRV. Anti-cardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983, 2: 1211-4.
27. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985, 62: 738-45.
28. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GRV. Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987, 68: 215-22.
29. Harris EN. The Second International Anticardiolipin Standardization Workshop/The Kingston Antiphospholipid Antibody (KAPS) Study Group. *Am J Clin Pathol* 1990, 94: 476-84.

30. Triplett DA, Brandt JT, Musgrave KA, Orr CA. The relationship between lupus anticoagulant and antibodies to phospholipids. *JAMA* 1988, 259: 550-4.
31. Lockshin MD, Qamar T, Druzin ML, Goei S. Antibody to cardiolipin, lupus anticoagulant, and fetal death. *J Rheumatol* 1987, 14: 259-62.
32. Derksen RH, Hasselaar P, Blokzijl L, Gmelig Meyling FHJ, de Groot PG. Coagulation screen is more specific than the anticardiolipin antibody ELISA in defining a thrombotic subset of lupus patients. *Ann Rheum Dis* 1988, 47: 364-71.
33. Exner T, Sahman N, Trudinger B. Separation of anticardiolipin antibodies from lupus anticoagulant on a phospholipid-coated polystyrene column. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 155: 1001-7.
34. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br J Haematol* 1989, 73: 506-13.
35. Mueller JF, Ratnoff O, Heinle RW. Observations on the characteristics of an unusual circulating anticoagulant. *J Lab Clin Med* 1951, 38: 254-61.
36. Loeliger A. Prothrombin as co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus? *Thromb Diath Haemorrh* 1959, 3: 237-56.
37. Yin ET, Gaston LW. Purification and kinetic studies on a circulating anticoagulant in a suspected case of lupus erythematosus. *Thromb Diath Haemorrh* 1965, 14: 88-115.
38. Thiagarajan P, Shapiro SS, De Marco L. Monoclonal immunoglobulin M λ coagulation inhibitor with phospholipid specificity: Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980, 66: 397-405.
39. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunologic specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulant. *Blood* 1987, 70: 69-76.
40. Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, Chan KH, Englert H, Mantelli P, Allegro F, Ballestrieri G, Hughes GRV. Affinity purified anti-cardiolipin antibodies and anti-DNA antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985, 17: 155-62.
41. Walton SP, Pierangeli SS, Campbell A, Klein E, Burchitt B, Harris EN. Demonstration of antiphospholipid antibody heterogeneity by phospholipid column chromatography and salt gradient elution techniques. *Lupus* 1995, 4: 263-71.
42. Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD, Hughes GRV. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and of inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disorders. *J Infect Dis* 1988, 157: 23-31.

43. Harris EN, Gharavi AE, Loizou S, Derue G, Chan JK, Patel BM, Mackworth-Young CG, Bunn CC, Hughes GRV. Crossreactivity of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985, 16: 1-6.
44. Branch DW, Rote NS, Dostal DA, Scott JR. Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine. *Clin Immunol Immunopathol* 1987, 42: 63-75.
45. Meyer O, Cyna L, Bourgeois P, Kahn MF, Ryckewaert A. Profile and cross-reactivities of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and syphilis. *Clin Rheumatol* 1987, 6: 369-77.
46. Harris EN, Pierangeli S, Birch D. Anticardiolipin wet workshop report. Fifth International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *Am J Clin Pathol* 1994, 101: 616-24.
47. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987, 46: 1-6.
48. Falcón CR, Hoffer AM, Forastiero RR, Carreras LO. Clinical significance of various ELISA assays for detecting antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1990, 64: 21-5.
49. Koike T, Tomioka H, Kumagai A. Antibodies cross-reactive with DNA and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1982, 50: 298-302.
50. Rauch J, Tannenbaum H, Stollar BD, Schwarz RS. Monoclonal anticardiolipin antibodies bind DNA. *Eur J Immunol* 1984, 14: 529-34.
51. Hasselaar P, Derksen RHW, Blokzijl L, de Groot PG. Crossreactivity of antibodies directed against cardiolipin, DNA, endothelial cells and blood platelets. *Thromb Haemost* 1990, 63: 169-73.
52. Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR. Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody. *J Clin Immunol* 1990, 10: 141-5.
53. Rauch J, Tannenbaum M, Tannenbaum H, Ramelson H, Cullis PR, Tilcock CPS, Hope MJ, Janoff AS. Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems. *J Biol Chem* 1986, 261: 9672-7.
54. Rauch J, Janoff AS. Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 4112-4.

55. Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR, Habina L, Qamar T, Lockshin MD. Characteristics of IgG antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and syphilis. *J Rheumatol* 1990, 17: 1036-41.
56. Pierangeli SS, Goldsmith GH, Krnic S, Harris EN. Differences in functional activity of anticardiolipin antibodies from patients with syphilis and those with antiphospholipid syndrome. *Infect Immun* 1994, 62: 4081-4.
57. Gharavi AE, Harris EN, Lockshin MD, Hughes GRV, Elkon KB. IgG subclass and light chain distribution of anticardiolipin and anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1988, 47: 286-90.
58. Clyne L. Species specificity of lupus-like anticoagulant. *Blut* 1986, 53: 287-92.
59. Bajaj SP, Rapaport SI, Fierer DS, Herbst KD, Schwartz DB. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983, 61: 684-91.
60. Fleck RA, Rapaport SI, Rao LVM. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988, 72: 512-9.
61. 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.
62. Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb Haemost* 1994, 71: 596-604.
63. Oosting JD, Derksen RHW, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: An explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993, 81: 2618-25.
64. Permpikul P, Rao LVM, Rapaport SI. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and β_2 -glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 1994, 83: 2878-92.
65. Rao LVM, Hoang AD, Rapaport SI. Differences in the interactions of lupus anticoagulant IgG with human prothrombin and bovine prothrombin. *Thromb Haemost* 1995, 73: 668-74.
66. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis 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.
67. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies

- (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990, 335: 1544-7.
68. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990, 336: 177-8.
 69. Lee NS, Brewer HB, Osborne JC. Beta 2-Glycoprotein I. Molecular properties of an unusual apolipoprotein, apolipoprotein H. *J Biol Chem* 1983, 258: 4765-70.
 70. Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma β_2 -glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 3640-4.
 71. Reid KBM, Day AJ. Structure-function relationships of the complement components. *Immunol Today* 1989, 10: 177-80.
 72. Schousboe I. β_2 -glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985, 66: 1086-91.
 73. McNally T, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. β_2 Glycoprotein-I inhibits factor XII activation on triglyceride rich lipoproteins: the effect of antibodies from plasma of patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1996, 76: 220-5.
 74. Schousboe I. Binding of β_2 Glycoprotein I to platelets: effect of adenylate cyclase activity. *Thromb Res* 1980, 19: 225-37.
 75. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. β_2 -glycoprotein I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis* 1987, 63: 109-14.
 76. Nimpf J, Bevers EM, Bomans PHH, Till U, Wurm H, Kostner GM, Zwaal RFA. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β_2 -glycoprotein I. *Biochim Biophys Acta* 1986, 884: 142-9.
 77. Shi W, Chong BH, Hogg PJ, Chesterman CN. Anticardiolipin antibodies block the inhibition by β_2 glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets. *Thromb Haemost* 1993, 70: 342-5.
 78. Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC, Suzuki K. β_2 -glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Thromb Haemost* 1996, 75: 49-55.
 79. Brighton TA, Hogg PJ, Dai YP, Murray BH, Chong BH, Chesterman CN. Beta₂-glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. *Br J Haematol* 1996, 93: 185-94.
 80. Wurm H. β_2 -Glycoprotein I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem* 1984, 16: 511-4.

81. Chonn A, Semple SC, Cullis PR. β_2 -glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of non-self particles. *J Biol Chem* 1995, 270: 25845-9.
82. Hunt J, Krilis S. The fifth domain of β_2 -glycoprotein I contains a phospholipid binding site (cys281-cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994, 152: 653-9.
83. Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA, Koike T. Human β_2 -glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using deleted mutants expressed by a baculovirus system. *Blood* 1996, 87: 3262-70.
84. Kertesz Z, Yu B, Steinkasserer A, Haupt H, Benham A, Sim RB. Characterization of binding of human β_2 -glycoprotein I to cardiolipin. *Biochem J* 1995, 310: 315-21.
85. Kandiah DA, Hunt JE, Krilis SA. Epitope mapping studies of antiphospholipid antibodies and β_2 GPI using synthetic peptides. *Lupus* 1995, 4: S7-11.
86. Hagihara Y, Goto Y, Kato H, Yoshimura T. Structure and function of β_2 -glycoprotein I: with special reference to the interaction with phospholipid. *Lupus* 1995, 4: S3-S5.
87. Wagenknecht DR, McIntyre JA. Changes in β_2 -glycoprotein-I antigenicity induced by phospholipid binding. *Thromb Haemost* 1993, 69: 361-5.
88. Borchman D, Harris EN, Pierangeli SS, Lamba OP. Interactions and molecular structure of cardiolipin and β_2 -glycoprotein-I (β_2 -GPI). *Clin Exp Immunol* 1995, 102: 373-8.
89. Sammaritano LR, Lockshin MD, Gharavi AE. Antiphospholipid antibodies differ in aPL cofactor requirement. *Lupus* 1992, 1: 83-90.
90. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid- β_2 -Glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992, 1: 75-81.
91. Ordi J, Selva A, Monegal F, Porcel JM, Martinez-Costa X, Vilardell M. Anticardiolipin antibodies and dependence of a serum cofactor. A mechanism of thrombosis. *J Rheumatol* 1993, 20: 1321-4.
92. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T, Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J Immunol* 1992, 148: 3885-91.
93. Jones JV, James H, Tan MH, Mansour M. Antiphospholipid antibodies require β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) as cofactor. *J Rheumatol* 1992, 19: 1397-402.

94. Pierangeli SS, Harris EN, Davis SA, DeLorenzo G. β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) enhances cardiolipin binding activity but is not the antigen for antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1992, 82: 565-70.
95. Harris EN, Pierangeli S, Barquinero J, Ordi-Ros J. Anticardiolipin antibodies and binding of anionic phospholipids and serum protein. *Lancet* 1991, 336: 505-6.
96. Oosting JD, Derksen RHW, Entjes HTI, Bouma BN, de Groot PG. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of β_2 -glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1992, 67: 499-502.
97. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM. Anticoagulant activity of β_2 -glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992, 68: 297-300.
98. Roubey RAS, Pratt CW, Buyon JP, Winfield JB. Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon β_2 -glycoprotein I. *J Clin Invest* 1992, 90: 1100-4.
99. Arvieux J, Pouzol P, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Lupus-like anticoagulant properties of murine monoclonal antibodies to β_2 -glycoprotein I. *Br J Haematol* 1992, 81: 568-73.
100. Brandt JT. Antibodies to β_2 -glycoprotein I inhibit phospholipid dependent coagulation reactions. *Thromb Haemost* 1993, 70: 598-602.
101. Matsuda J, Gohchi K, Tsukamoto M, Saitoh N, Asami K, Hashimoto M. Anticoagulant activity of an anti- β_2 -glycoprotein I antibody is dependent on the presence of β_2 -glycoprotein I. *Am J Hematol* 1993, 44: 187-91.
102. Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. *Blood* 1995, 86: 3083-9.
103. Boffa MC, Berard M, Sugi T, McIntyre JA. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies detected by ELISA. II. Kininogen reactivity. *J Rheumatol* 1996, 23: 1375-9.
104. Sugi T, McIntyre JA. Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies. *Thromb Haemost* 1996, 76: 354-60.
105. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989, 264: 4743-9.
106. Green D, Hougie C, Kazmier FJ, Lechner K, Mannucci PM, Rizza CR, Sultan Y. Report of the working party on acquired inhibitors of coagulation: studies on the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1983, 49: 144-9.

107. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1991, 65: 320-2.
108. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: An update. *Thromb Haemost* 1995, 74: 1185-90.
109. Sletnes KE, Graven K, Wisloff F. Preparation of plasma for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 1992, 66: 43-53.
110. Kelsey PR, Stevenson KJ, Poller L. The diagnosis of lupus anticoagulants by the activated partial thromboplastin time: the central role of phosphatidyl serine. *Thromb Haemost* 1984, 52: 172-5.
111. Denis-Magdelaine A, Flahault A, Verdy E. Sensitivity of sixteen APTT reagents for the presence of lupus anticoagulants. *Haemostasis* 1995, 25: 98-105.
112. Forastiero RR, Cerrato GS, Carreras LO. Evaluation of recently described tests for detection of the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1994, 72: 728-33.
113. Exner T. Comparison of two simple tests for the lupus anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1985, 83: 215-8.
114. Rosner E, Pauzner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 1987, 57: 144-7.
115. Forastiero RR, Falcón CR, Carreras LO. Comparison of various screening and confirmatory tests for the detection of the lupus anticoagulant. *Haemostasis* 1990, 20: 208-14.
116. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986, 68: 869-72.
117. Arnout J, Vanrusselt M, Huybrechts E, Vermeylen J. Optimization of the dilute prothrombin time for the detection of the lupus anticoagulant by use of a recombinant tissue thromboplastin. *Br J Haematol* 1994, 87: 94-9.
118. Triplett DA, Stocker KF, Unger GA, Barna LK. The Textarin/Ecarin ratio: a confirmatory test for lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1993, 70: 925-32.
119. Rooney AM, McNally T, Mackie IJ, Machin SJ. The Taipan snake venom time: a new test for lupus anticoagulant. *J Clin Pathol* 1994, 47: 497-501.
120. Exner T. Diagnostic methodologies for circulating anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995, 74: 338-44.
121. Triplett DA. Antiphospholipid-protein antibodies: laboratory detection and clinical relevance. *Thromb Res* 1995, 78: 1-31.
122. Goudemand J, Caron C, De Prost D, Derlon A, Borg JY, Sampol J, Sié P. Evaluation of sensitivity and specificity of a standardized procedure using

- different reagents for the detection of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1997, 77: 336-42.
123. Triplett DA, Brandt JT, Kaczor D, Schaeffer J. Laboratory diagnosis of lupus inhibitors: a comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new platelet neutralization procedure. *Am J Clin Pathol* 1983, 79: 678-82.
 124. Arnout J, Huybrechts E, Vanrusselt M, Vermynen J. A new lupus anticoagulant neutralization test based on platelet-derived vesicles. *Br J Haematol* 1992, 80: 341-6.
 125. Rosove MH, Ismail M, Koziol BJ, Runge A, Kasper CK. Lupus anticoagulants: improved diagnosis with a kaolin clotting time using rabbit brain phospholipid in standard and high concentrations. *Blood* 1986, 68: 472-8.
 126. Rauch J, Tannenbaum H, Janoff AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal (II) phase phospholipids. *Thromb Haemost* 1989, 62: 892-6.
 127. Stevenson KJ, Seddon JM. The role of lipids in the detection of lupus anticoagulant by the dilute Russell viper venom test: are platelets or reagents containing hexagonal H_{II} phases necessary? *Br J Haematol* 1994, 86: 583-9.
 128. Harris EN. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990, 74: 1-9.
 129. Hughes JR, Davies JA, Prentice CRM. The effect of different microtitre plates on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for anticardiolipin antibodies (ACAs). *Thromb Res* 1996, 84: 217-22.
 130. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Gotoh M, Tsukamoto M. Distinguishing β_2 -glycoprotein I dependent (systemic lupus erythematosus type) and independent (syphilis type) anticardiolipin antibody with Tween 20. *Br J Haematol* 1993; 85: 799-802.
 131. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Tween-20 detaches cardiolipin from ELISA plates and makes anticardiolipin antibodies undetectable regardless of the presence of β_2 -glycoprotein-I. *J Immunol Methods* 1994, 175: 107-14.
 132. Cowchock FS, Fort JG. Can tests for IgA, IgG, or IgM antibodies to cardiolipin or phosphatidylserine substitute for lupus anticoagulant assays in screening for antiphospholipid antibodies? *Autoimmunity* 1994, 17: 119-22.
 133. Arnout J, Huybrechts E, Vanrusselt M, Falcon C, Vermynen J. Detection of lupus-like anticoagulants by an enzyme-linked immunosorbent assay using a partial thromboplastin antigen: a comparative study. *Thromb Haemost* 1990, 64: 26-31.
 134. Toschi V, Motta A, Castelli C, Gibelli S, Cimminiello C, Molaro GL, Gibelli A. Prevalence and clinical significance of antiphospholipid antibodies to

- noncardiolipin antigens in systemic lupus erythematosus. *Haemostasis* 1993, 23: 275-83.
135. Berard M, Chantome R, Marcelli A, Boffa MC. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies. I. Association with thrombosis and vascular cutaneous diseases. *J Rheumatol* 1996, 23: 1369-74.
 136. Laroche P, Berard M, Rouquette AM, Desgruelle C, Boffa MC. Advantage of using both anionic and zwitterionic phospholipid antigens for the detection of antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol* 1996, 106: 549-54.
 137. Harris EN, Pierangeli SS. A more specific ELISA assay for the detection of antiphospholipid antibodies. *Clin Immunol Newsletter* 1995, 15: 26-8.
 138. Stewart MW, Etches WS, Russell AS, Percy JS, Johnston CA, Chew CK, Gordon PA. Detection of antiphospholipid antibodies by flow cytometry: rapid detection of antibody isotype and phospholipid specificity. *Thromb Haemost* 1993, 70: 603-7.
 139. Vila P, Hernández MC, López-Fernández MF, Batlle J. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb Haemost* 1994, 72: 209-13.
 140. Harris EN. The antiphospholipid syndrome - an introduction. In: *Phospholipid-Binding Antibodies*. Harris EN, Exner T, Hughes GRV, Asherson RA, eds. Boca Raton, Florida (USA). CRC Press 1991, 373-86.
 141. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986, 13: 486-9.
 142. Asherson RA. A primary antiphospholipid syndrome? *J Rheumatol* 1988, 15: 1742-6.
 143. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1992, 21: 275-86.
 144. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, Outt HH, Harris EN, Vilardell-Torres M, Hughes GR. The primary antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine* 1989, 68: 366-74.
 145. Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, Stevens P, Hirsh J. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995, 86: 3685-91.
 146. Horbach DA, Oort EV, Donders RCJM, Derksen RHWM, de Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis

- in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1996, 76: 916-24.
147. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciavarella N, Mazzucconi G, Schinco P, Ruggeri M, Pogliani EM, Gamba G, Rossi E, Baudo F, Manotti C, D'Angelo A, Palareti G, De Stefano V, Berrettini M, Barbui T. 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.
 148. Vaarala O, Mänttari M, Manninen V, Tenkanen L, Puurunen M, Aho K, Palosuo T. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995, 91: 23-7.
 149. Silver RM, Porter TF, van Leeuwen I, Jeng G, Scott JR, Branch W. Anticardiolipin antibodies: clinical consequences of low titers. *Obstet Gynecol* 1996, 87: 494-500.
 150. Triplett DA. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 1989, 20: 52-7.
 151. Ginsberg JS, Brill-Edwards P, Johnston M, Denburg JA, Andrew M, Burrows RF, Bensen W, Cividino A, Long AA. Relationship of antiphospholipid antibodies to pregnancy loss in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Blood* 1992, 80: 975-80.
 152. Oshiro BT, Silver RM, Scott JR, Yu H, Branch W. Antiphospholipid antibodies and fetal death. *Obstet Gynecol* 1996, 87: 489-93.
 153. Harris EN, Gharavi AE, Hedge U, Derue G, Morgan SH, Englert H, Chan JKH, Asherson RA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1985, 59: 231-4.
 154. Galli M, Finazzi G, Barbui T. Thrombocytopenia in the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 1996, 93: 1-5.
 155. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Font J, Cervera R, Lopez-Soto A, Tolosa C, Franz J, Selva A, Ingelmo M, Vilardell M, Hughes GRV. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a european multicenter study of 114 patients. *Am J Med* 1994, 96: 3-9.
 156. Levy RA. Clinical manifestations of the aPL syndrome. *Lupus* 1996, 5: 393-7.
 157. Al-Saeed A, Makris M, Malia RG, Preston FE, Greaves M. The development of antiphospholipid antibodies in haemophilia is linked to infection with hepatitis C. *Br J Haematol* 1994, 88: 845-8.
 158. Stimmler MM, Quismorio FP, McGehee WG, Boylen T, Sharma OM. Anticardiolipin antibodies in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 1989, 149: 1833-5.

159. Moncada S, Vane JR. Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. *Br Med Bull* 1978, 34: 129-35.
160. Carreras LO, Defreyn G, Machin SJ, Vermeylen J, Deman R, Spitz B, Van Assche A. Arterial thrombosis, intrauterine death and lupus anticoagulant: detection of immunoglobulin interfering with prostacyclin formation. *Lancet* 1981, 1: 244-6.
161. Schörer AE, Wickham NWR, Watson KV. Lupus anticoagulant induces a selective defect in thrombin-mediated endothelial prostacyclin release and platelet aggregation. *Br J Haematol* 1989, 71: 399-407.
162. Watson KV, Schorer AE. Lupus anticoagulant inhibition of in vitro prostacyclin release is associated with a thrombosis-prone subset of patients. *Am J Med* 1991, 90: 47-53.
163. Schorer AE, Duane PG, Woods VL, Niewoehner DE. Some antiphospholipid antibodies inhibit phospholipase A₂ activity. *J Lab Clin Med* 1992, 120: 67-77.
164. Hasselaar P, Derksen RHW, Blokzijl L, de Groot PG. Thrombosis associated with antiphospholipid antibodies cannot be explained by effects on endothelial and platelet prostanoid synthesis. *Thromb Haemost* 1988, 59: 80-5.
165. Cariou R, Tobelem G, Bellucci S, Soria J, Soria C, Maclouf J, Caen J. Effect of lupus anticoagulant on antithrombotic properties of endothelial cells. Inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb Haemost* 1988, 60: 54-8.
166. Catella F, Healy D, Lawson JA, FitzGerald GA. 11-dehydrothromboxane B₂: a quantitative index of thromboxane A₂ formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 5861-5.
167. Lellouche F, Martinuzzo M, Said P, Maclouf J, Carreras LO. Imbalance of thromboxane/prostacyclin biosynthesis in patients with lupus anticoagulant. *Blood* 1991, 78: 2894-9.
168. Arfors L, Vesterqvist O, Johnsson H, Gréen K. Increased thromboxane formation in patients with antiphospholipid syndrome. *Eur J Clin Invest* 1990, 20: 607-12.
169. Lin YL, Wang CT. Activation of human platelets by the rabbit anticardiolipin antibodies. *Blood* 1992, 80: 3135-43.
170. Martinuzzo ME, Maclouf J, Carreras LO, Lévy Toledano S. Antiphospholipid antibodies enhance thrombin-induced platelet activation and thromboxane formation. *Thromb Haemost* 1993, 70: 667-71.

171. Shi W, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus anticoagulants. *Blood* 1993, 81: 1255-62.
172. Campbell AL, Pierangeli SS, Wellhausen S, Harris EN. Comparison of the effects of anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome and with syphilis on platelet activation and aggregation. *Thromb Haemost* 1995, 73: 529-34.
173. Habib A, Martinuzzo ME, Carreras LO, Lévy-Toledano S, Maclouf J. Increased expression of inducible cyclooxygenase-2 in human endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1995, 74: 770-7.
174. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993, 70: 29-35.
175. Ishii H, Majerus PW. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 1985, 76: 2178-81.
176. Smirnov MD, Triplett DT, Comp PhC, Esmon NL, Esmon ChT. On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995, 95: 309-16.
177. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 1004-8.
178. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994, 369: 64-7.
179. Comp PC, deBault LE, Esmon NL, Esmon CT. Human thrombomodulin is inhibited by IgG from two patients with non-specific anticoagulants. *Blood* 1983, 62: 299 (abs).
180. Freyssinet JM, Wiesel ML, Gauchy J, Boneu B, Cazenave JP. An IgM lupus anticoagulant that neutralizes the enhancing effect of phospholipids on purified endothelial thrombomodulin activity. A mechanism for thrombosis. *Thromb Haemost* 1986, 55: 309-13.
181. Pötzch B, Kawamura H, Preissner KT, Schmidt M, Seelig C, Müller-Berghaus G. Acquired protein C dysfunction but not decreased activity of thrombomodulin is a possible marker of thrombophilia in patients with lupus anticoagulant. *J Lab Clin Med* 1995, 125: 56-65.
182. Gibson J, Nelson M, Brown R, Salem H, Kronenberg H. Autoantibodies to thrombomodulin: development of an enzyme immunoassay and a survey of their

- frequency in patients with the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1992, 67: 507-9.
183. Marciniak E, Romond EH. Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. *Blood* 1989, 74: 2426-32.
 184. Malia RG, Kitchen S, Greaves M, Preston FE. Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990, 76: 101-7.
 185. Borell M, Sala N, de Castellarnau C, Lopez S, Gari M, Fontcuberta J. Immunoglobulin fractions isolated from patients with antiphospholipid antibodies prevent the inactivation of factor Va by activated protein C on human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1992, 68: 268-72.
 186. Matsuda J, Gohchi K, Tsukamoto M, Gotoh M, Saitoh N, Kawasugi K. Resistance to activated protein C in systemic lupus erythematosus with antiphospholipid antibodies. *Eur J Haematol* 1994, 53: 188-9.
 187. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles A. Activated protein C resistance phenotype and genotype in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Blood Coag Fibrinol* 1996, 7: 344-8.
 188. Bokarewa MI, Bremme K, Falk G, Sten-Linder M, Egberg N, Blombäck M. Studies on phospholipid antibodies, APC-resistance and associated mutation in the coagulation factor V gene. *Thromb Res* 1995, 78: 193-200.
 189. Kordich LC, Forastiero RR, Basilotta E, Porterie P, Carreras LO. Natural inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis in patients with lupus anticoagulant. *Blood Coag Fibrinol* 1992, 3: 765-71.
 190. Forastiero RR, Kordich L, Basilotta E, Carreras LO. Differences in protein S and C4b-binding protein levels in different groups of patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coag Fibrinol* 1994, 5: 609-16.
 191. Hasselaar P, Derksen RHWM, Oosting JD, Blokzijl L, de Groot PG. Synergistic effect of low doses of tumor necrosis factor and sera from patients with systemic lupus erythematosus on the expression of procoagulant activity by cultured endothelial cells. *Thromb Haemost* 1989, 62: 654-60.
 192. Oosting JD, Derksen RHWM, Blokzijl L, Sixma JJ, de Groot PG. Antiphospholipid antibody positive sera enhance endothelial cell procoagulant activity-Studies in a thrombosis model. *Thromb Haemost* 1992, 68: 278-84.
 193. Branch DW, Rodgers GM. Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: A possible mechanism of thrombosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993, 168: 206-10.

194. Kornberg A, Blank M, Kaufman S, Shoenfeld Y. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994, 153: 1328-32.
195. Keeling DM, Campbell SJ, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. The fibrinolytic response to venous occlusion and the natural anticoagulants in patients with antiphospholipid antibodies both with and without systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 1991, 77: 354-9.
196. Tsakiris DA, Marbet GA, Makris PE, Settas L, Duckert F. Impaired fibrinolysis as an essential contribution to thrombosis in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1989, 61: 175-7.
197. Violi F, Ferro D, Valesini G, Quintarelli C, Saliola M, Grandilli MA, Balsano F. Tissue plasminogen activator inhibitor in patients with systemic lupus erythematosus and thrombosis. *Br Med J* 1990, 300: 1099-102.
198. Mackworth-Young CG, Andreotti F, Harmer I, Loizou S, Pottinger BE, Pearson JD, Davies GJ, Maseri A, Walport MJ. Endothelium-derived haemostatic factors and the antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1995, 34: 201-6.
199. Galli M, Daldossi M, Barbui T. Anti-glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1994, 71: 571-5.
200. Tokita S, Arai M, Yamamoto N, Katagiri Y, Tanoue K, Igarashi K, Umeda M, Inoue K. Specific cross-reaction of IgG anti-phospholipid antibody with platelet glycoprotein IIIa. *Thromb Haemost* 1996, 75: 168-74.
201. Shibata S, Harpel PC, Gharavi A, Rand J, Fillit H. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III-thrombin complexes. *Blood* 1994, 83: 2532-40.
202. Ginsberg JS, Demers C, Brill-Edwards P, Johnston M, Bona R, Burrows RF, Weitz J, Denburg JA. Increased thrombin generation and activity in patients with systemic lupus erythematosus and anticardiolipin antibodies: evidence for a prothrombotic state. *Blood* 1993, 81: 2958-63.
203. Lindsey NJ, Dawson RA, Henderson FI, Greaves M, Hughes P. Stimulation of von Willebrand factor antigen release by immunoglobulin from thrombosis prone patients with systemic lupus erythematosus and the anti-phospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1993, 32: 123-6.
204. Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara P, Borghi MO, Tincani A, Balestrieri G, Meroni PL. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies: β_2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial

- membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clin Exp Rheumatol* 1995, 13: 179-85.
205. Le Tonquèze M, Salozhin K, Dueymes M, Piette JC, Kovalev V, Shoenfeld Y, Nasonov E, Youinou P. Role of β_2 -glycoprotein I in the antiphospholipid antibody binding to endothelial cells. *Lupus* 1995, 4: 179-86.
 206. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995, 96: 2211-9.
 207. Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 1624-9.
 208. Price BE, Rauch J, Shia MA, Walsh MT, Lieberthal W, Gilligan HM, O'Laughlin T, Koh JS, Levine JS. Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a β_2 -glycoprotein I-dependent manner. *J Immunol* 1996, 157: 2201-8.
 209. Sammaritano LR, Gharavi AE. Antiphospholipid antibodies and placental anticoagulant protein I. *Lupus* 1994, 3: 263-5.
 210. Pierangeli SS, Dean J, Goldsmith GH, Branch DW, Gharavi A, Harris EN. Studies on the interaction of placental anticoagulant protein I, β_2 glycoprotein 1, and antiphospholipid antibodies in the prothrombinase reaction and in the solid phase anticardiolipin assays. *J Lab Clin Med* 1996, 128: 194-201.
 211. La Rosa L, Meroni PL, Tincani A, Balestrieri G, Faden D, Lojacono A, Morassi L, Brocchi E, Del Papa N, Gharavi A, Sammaritano L, Lockshin M. β_2 Glycoprotein I and placental anticoagulant protein I in placentae from patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1994, 21: 1684-93.
 212. Rand JH, Wu XX, Guller S, Gil J, Guha A, Scher J, Lockwood CJ. Reduction of annexin-V (placental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1994, 171: 1566-72.
 213. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Gotoh M, Tsukamoto M. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. *Am J Hematol* 1994, 47: 56-8.
 214. Amiral J, Larrivaz I, Cluzeau D, Adam M. Standardization of immunoassays for antiphospholipid antibodies with β_2 GPI and role of other phospholipid cofactors. *Haemostasis* 1994, 24: 191-203.

215. Hashimoto Y, Kawamura M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yoshida S, Matsuura E, Ikehara S, Koike T. Anticardiolipin antibodies in (NZW x BXSB) F1 mice: a model of antiphospholipid syndrome. *J Immunol* 1992, 149: 1063-8.
216. Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, Creightari KA, Abott JM, Hammond EH, Daynes RA. Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies caused fetal death in Balb/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1990, 163: 210-6.
217. Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction of antiphospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anticardiolipin antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 3069-73.
218. Bakimer R, Fishman P, Blank M, Srednc B, Djaidetti M, Shoenfeld Y. Induction of primary antiphospholipid syndrome in mice by immunization with a human monoclonal anticardiolipin antibody (H-3). *J Clin Invest* 1992, 89: 1558-63.
219. Vogt E, Ng AK, Rote NS. A model for the antiphospholipid antibody syndrome: monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1996, 174: 700-7.
220. Pierangeli SS, Barker JH, Stikovac D, Ackerman D, Anderson G, Barquinero J, Acland R, Harris EN. Effect of human IgG antiphospholipid antibodies on an in vivo thrombosis model in mice. *Thromb Haemost* 1994, 71: 670-4.
221. Olee T, Pierangeli SS, Handley HH, Le DT, Wei X, Lai CJ, En J, Novotny W, Harris EN, Woods VL, Chen PP. A monoclonal IgG anticardiolipin antibody from a patient with the antiphospholipid syndrome is thrombogenic in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 8606-11.
222. Pierangeli SS, Liu XW, Anderson G, Barker JH, Harris EN. Thrombogenic properties of murine anti-cardiolipin antibodies induced by β_2 glycoprotein 1 and human immunoglobulin G antiphospholipid antibodies. *Circulation* 1996, 94: 1746-51.
222. (bis) Recomendación aprobada sobre teoría de los valores de referencia. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 1988, XXII (3): 443.
223. Zilversmit DB, Davis AK. Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation. *J Lab Clin Med* 1950, 35: 155-60.
224. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantitatives of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochemistry* 1976, 72: 248-54.

225. Pengo V, Biasiolo A. Purification of anticardiolipin and lupus anticoagulant activities by using cardiolipin immobilized on agarose beads. *Thromb Res* 1993, 72: 423-30.
226. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-5.
227. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76: 4350-4.
228. Lellouche F, Fradin A, FitzGerald G, Maclouf J. Enzyme immunoassay measurement of the urinary metabolites of thromboxane A₂ and prostacyclin. *Prostaglandins* 1990, 40: 297-310.
229. Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: An alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* 1985, 57: 1170-3.
230. Onyiriuka EC, Hersh IS, Herti W. Surface modification of polystyrene by gamma-radiation. *Appl Spectrom* 1990, 44: 808-11.
231. Jones JV, Eastwood BJ, Jones E, James H, Mansour M. Antiphospholipid antibodies in a healthy population: methods for estimating the distribution. *J Rheumatol* 1995, 22: 55-61.
232. Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using β_2 -glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods* 1991, 143: 223-9.
233. Viard JP, Amoura Z, Bach JF. Association of anti β_2 -glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992, 93: 181-6.
234. Pierangeli SS, Harris EN, Gharavi AE, Goldsmith G, Branch DW, Dean WL. Are immunoglobulins with lupus anticoagulant activity specific for phospholipids? *Br J Haematol* 1993, 85: 124-32.
235. Pengo V, Biasiolo A, Fior MG. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when β_2 -glycoprotein I is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost* 1995, 73: 29-34.
236. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize β_2 -glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994, 179: 457-62.
237. 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.
238. Cabiedes J, Cabral A, Alarcón-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- β_2 -glycoprotein I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995, 22: 1899-906.
 239. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Antibodies to phospholipid-free β_2 -glycoprotein I in patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1995, 22: 1894-8.
 240. 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: 1120-25.
 241. Koike T, Tsutsumi A, Ichikawa K, Matsuura E. Antigen specificity of the anticardiolipin antibodies. *Blood* 1995, 85: 2277-8.
 242. Nomura M, Okada J, Kondo H. Detection of anti-bovine β_2 -glycoprotein-I antibody in sera from patients with antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int* 1995, 15: 1-8.
 243. Arvieux J, Roussel B, Ponard D, Colomb MG. IgG₂ subclass restriction of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in autoimmune patients. *Clin Exp Immunol* 1994, 95: 310-5.
 244. McNally T, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. The use of an anti- β_2 -glycoprotein-I assay for discrimination between anticardiolipin antibodies associated with infection and increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 1995, 91: 471-3.
 245. Balestrieri G, Tincani A, Spatola L, Allegri F, Prati E, Cattaneo R, Valesini G, Del Papa N, Meroni P. Anti-beta₂-glycoprotein I antibodies: a marker of antiphospholipid syndrome? *Lupus* 1995, 4: 122-30.
 246. Galli M, Daldossi M, Cortelazzo S, Barbui T. Increased levels of β_2 -glycoprotein I (aca-cofactor) in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1992, 67: 386.
 247. Keeling DM, Wilson AJG, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. Some antiphospholipid antibodies bind to β_2 -glycoprotein-I in the absence of phospholipid. *Br J Haematol* 1992, 82: 571-4.
 248. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost* 1996, 75: 721-4.

249. Gharavi AE, Sammaritano LR, Bovastro JL, Wilson WA. Specificities and characteristics of β_2 -glycoprotein I-induced antiphospholipid antibodies. *J Lab Clin Med* 1995, 125: 775-8.
250. Kouts S, Wang MX, Adelstein S, Krilis SA. Immunization of a rabbit with β_2 -glycoprotein I induces charge-dependent crossreactive antibodies that bind anionic phospholipids and have similar reactivity as autoimmune antiphospholipid antibodies. *J Immunol* 1995, 155: 958-66.
251. Sorice M, Circella A, Griggi T, Garofalo T, Nicodemo G, Pittoni V, Pontieri GM, Lenti L, Valesini G. Anticardiolipin and anti- β_2 -GPI are two distinct populations of autoantibodies. *Thromb Haemost* 1996, 75: 303-8.
252. Hörkkö S, Miller E, Dudl E, Reaven P, Curtiss LK, Zvaifler NJ, Terkeltaub R, Pierangeli SS, Branch DW, Palinski W, Witztum JL. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1996, 98: 815-25.
253. Arvieux J, Darnige L, Hachulla E, Roussel B, Bensa JC, Colomb MG. Species specificity of anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibody quantitation. *Thromb Haemost* 1996, 75: 725-30.
254. Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, Kawasugi K, Gohchi K, Tsukamoto M. Phosphatidyl serine-dependent antiprothrombin antibody is exclusive to patients with lupus anticoagulant. *Br J Rheumatol* 1996, 35: 589-91.
255. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997, 77: 486-91.
256. Vaarala O, Puurunen M, Mänttari M, Manninen V, Aho K, Palosuo T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost* 1996, 75: 456-9.
257. 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.
258. Aoki K, Matsuura E, Sasa H, Yagami Y, Dudkiewicz AB, Gleicher N. β_2 -Glycoprotein I-dependent and -independent anticardiolipin antibodies in healthy pregnant women. *Human Reprod* 1994, 9: 1849-51.
259. Aoki K, Dudkiewicz AB, Matsuura E, Novotny M, Kaberlein G, Gleicher N. Clinical significance of β_2 -glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in the reproductive autoimmune failure syndrome: correlation with conventional

- antiphospholipid antibody detection systems. *J Obstet Gynecol* 1995, 172: 926-31.
260. Galli M, Finazzi G, Bevers E, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and β_2 -glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 1995, 86: 617-23.
 261. Pengo V, Balestrieri G, Tincani A, Spatola L, Biasiolo A, Brocco T. Utilization of dilute Russell's viper venom time to detect autoantibodies against β_2 -glycoprotein I which express anticoagulant activity in the presence but not in the absence of exogenous phospholipids. *Thromb Haemost* 1997, 77: 123-6.
 262. Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood* 1990, 76: 2024-9.
 263. Ishii H, Uchiyama H, Kazama M. Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. *Thromb Haemost* 1991, 65: 618-23.
 264. Boheme MWJ, Nawroth PP, Kling E, Lin J, Amiral J, Riedesel J, Raeth U, Scherbaum WA. Serum thrombomodulin. A novel marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994, 4: 572-7.
 265. Ohdama S, Yoshizawa Y, Kubota T, Aoki N. Plasma thrombomodulin as an indicator of thromboembolic disease in systemic lupus erythematosus. *Int J Cardiol* 1994, 47(Suppl 1): 1-6.
 266. Karmochkine M, Boffa MC, Piette JC, Cacoub P, Wechsler B, Godeau P, Juhan I, Weiller PJ. Increase in plasma thrombomodulin in lupus erythematosus with antiphospholipid antibodies. *Blood* 1992, 79: 837-8.
 267. Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, Constans J, Mercié P, Pruvost A, Amiral J, Midy D, Baste JC, Boisseau MR. Levels of plasma thrombomodulin are increased in atheromatous arterial disease. *Thromb Res* 1993, 71: 423-31.
 268. Halbmayr WM, Haushofer A, Schon R, Fischer M. Influence of lupus anticoagulants on a commercially available kit for APC-resistance. *Thromb Haemost* 1994, 72: 645-6.
 269. Matsuda J, Gohchi K, Kawasugi K, Gotoh M, Saitoh N, Tsukamoto M. Inhibitory activity of anti β_2 glycoprotein I antibody on factor Va degradation by activated protein C and its cofactor protein S. *Am J Hematol* 1995, 49: 89-91.
 270. Matsuda J, Gotoh M, Gohchi K, Kawasugi K, Tsukamoto M, Saitoh N. Resistance to activated protein C activity of an anti β_2 glycoprotein I antibody in the presence of β_2 glycoprotein I. *Br J Haematol* 1995, 90: 204-6.

271. Gouault-Heilmann M, Leroy-Matheron C. Factor V Leiden-dependent APC resistance: Improved sensitivity and specificity of the APC resistance test by plasma dilution in factor V depleted plasma. *Thromb Res* 1996, 82: 281-3.
272. Patrono C, Ciabattini G, Remuzzi G, Gotti E, Bombardieri S, Di Minno O, Tartarelli GA, Simonetti BM, Pierucci A. Functional significance of renal prostacyclin and thromboxane A₂ production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1985, 76: 1011-8.
273. Arvieux J, Roussel B, Pouzol P, Colomb MG. Platelet activating properties of murine monoclonal antibodies to beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1993, 70: 336-41.
274. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996, 75: 536-41.
275. Vermynen J, Arnout J. Is the antiphospholipid syndrome caused by antibodies directed against physiologically relevant phospholipid-protein complexes? *J Lab Clin Med* 1992, 120: 10-2.
276. Roubey RAS. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other antiphospholipid autoantibodies. *Blood* 1994, 84: 2854-67.
277. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996, 39: 1444-54.