



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

5
2y.

**ESTUDIO INMUNOGENETICO DE PACIENTES CON
SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS
PRIMARIO Y PACIENTES CON LEG.**

T E S I S

GUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA**

JAVIER CABIEDES CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. DONATO ALARCON-SEGOVIA

FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX

1989.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

J U R A D O

PRESIDENTE

Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa

VOCAL

Q.F.B. Ma. Esther Revueltas Miranda.

SECRETARIO

Dr. Donato Alarcón-Segovia.

1ER. SUPLENTE

Q.F.B. Andres Romero Rojas.

2°. SUPLENTE

Q.F.B. Susana E. Mendoza Elvira.

I N D I C E

	HOJA.
ABREVIATURAS.....	VI
1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCION.....	5
3. GENERALIDADES	
3.1 Antecedentes históricos.....	9
3.2 Anticoagulantes lúpico.....	12
3.3 Anticuerpos anti-cardiolipina.....	15
3.4 Anticuerpos anti-fosfolípidos.....	19
3.4.1 Frecuencia.....	19
3.4.2 Trombosis.....	20
3.4.3 Pérdida fetal.....	23
3.4.4 Trombocitopenia y prueba de Coomb's positiva.....	24
3.4.5 Desórdenes vasospásticos.....	25
3.4.6 Desórdenes neurológicos.....	26
3.4.7 Hipocomplementemia.....	26
3.5 Síndrome de anticuerpos anti- fosfolípidos.....	28
3.6 Complejo principal de histocompatibilidad.....	29
3.6.1 Sistema del complemento.....	33
3.6.2 Deficiencias de componentes del complemento.....	33

	HOJA.
3.6.3 Polimorfismo del HLA.....	36
3.6.4 Polimorfismo del sistema del complemento.....	38
4. OBJETIVOS.....	42
5. MATERIAL Y METODOS	
5.1 Criterios de inclusión de pacientes con "Síndrome de anti-fosfolípidos primarios"...	44
5.2 Pacientes con LEG.....	46
5.3 Determinación de anticuerpos anti- cardiolipina.....	46
5.3.1 Manejo de las muestras.....	47
5.4 Tipificación de los antígenos HLA-A y HLA-B.....	52
5.4.1 Manejo de las muestras.....	52
5.5 Tipificación de complotipos.....	55
5.5.1 Manejo de las muestras.....	55
5.5.2 Factor B de la vía alterna del complemento.....	55
5.5.3 Cuarto componente del complemento.....	59
5.5.4 Segundo componente del complemento.....	62
6. RESULTADOS.....	67
7. DISCUSION.....	94
8. CONCLUSIONES.....	100

	HOJA.
GLOSARIO.....	103
BIBLIOGRAFIA.....	108

INDICE DE TABLAS.

TABLA	TITULO	HOJA.
1	CARACTERISTICAS DE LOS 19 COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.....	34
2	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.....	35
3	DEFICIENCIAS DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.....	37
4	ALELOS DE LOS LOCUS DEL SISTEMA HLA.....	39
5	POLIMORFISMO DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS MOLECULAS DEL COMPLEMENTO.....	40
6	DETERMINACIONES REALIZADAS A LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS.....	45
7	VALORES NORMALES DE LOS INDICES DE I _G E I _G M.....	69
8	COMOTIPOS Y SU RELACION CON POSITIVIDAD A ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA.....	72
9	POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN PACIENTES CON "SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS PRIMARIOS".....	73
10	POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA CON RESPECTO A CLASE DE INMUNOGLOBULINA.....	74
11	POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA CON RESPECTO AL SEXO.....	76
12	POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN FAMILIARES DE PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	78
13	MOLECULAS CLASE I.....	80
14	MOLECULAS CLASE II.....	81
15	MOLECULAS CLASE III.....	82
16	FRECUENCIA DE COMOTIPOS EN PACIENTES CON "SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS PRIMARIO".....	83

TABLA	TITULO	HOJA.
17	COMPLETIPOS Y SU RELACION CON POSITIVIDAD A ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN PACIENTES CON LEG.....	85
18	HAPLOTIPOS DE LOS PACIENTES CON EL SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS "PRIMARIO".....	86

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA	TITULO	HOJA.
1	CASCADA DE LA COAGULACION.....	14
2	COMPARACION DE 4 ESTRUCTURAS CON GRUPOS FOSFODIESTER DE CARGA NEGATIVA.....	18
3	MAPA FISICO DE LA REGION HLA HUMANO.....	32
4	ELISA INDIRECTO.....	50
5a	INDICES DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA CLASE I _G EN INDIVIDUOS NORMALES.....	68
5b	INDICES DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA CLASE I _M EN INDIVIDUOS NORMALES.....	68
6	INDICES DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN FAMILIARES DE PACIENTES CON LEG.....	70
7	INDICE DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN FAMILIARES DE PACIENTES CON EL "SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS PRIMARIO".....	77
8	ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 1.....	87
9	ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 2.....	88
10	ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 3.....	89
11	ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 4.....	90
12	ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 5.....	91
13	ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 6.....	92

A B R E V I A T U R A S

AAN	Anticuerpos anti-nucleares.
aCL	Anti-cardiolipina.
AHA	Anemia hemolítica autoinmune.
AL	Anticoagulante lúpico.
APTT	Activated partial thromboplastin time. Tiempo de tromboplastina parcial activa.
AR	Artritis reumatoide.
BFP	Biológicamente falso positivo.
°C	Grados Centígrados.
cdDNA	Acido desoxirribonucleico de cadena doble.
CIC	Complejos inmunes circulantes.
cm	Centimorgans.
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad.
C2	Segundo componente del sistema del complemento.
C3	Tercer componente del sistema del complemento.
C4	Cuarto componente del sistema del complemento.
C4A	Locus A del cuarto componente del complemento.
C4B	Locus B del cuarto componente del complemento.
DE	Desviación estándar.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
DO	Densidad óptica.
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent assay. Ensayo inmuno enzimático.
EMTC	Enfermedad mixta del tejido conjuntivo.
fB	Factor B de la vía alterna del complemento.
Hb	Hemoglobina.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos.

IgA Inmunoglobulina clase A.
IgG Inmunoglobulina clase G.
IgM Inmunoglobulina clase M.
INNSZ Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".
kb Kilobases.
kg Kilogramos.
LEG Lupus eritematoso generalizado.
mA Miliampers.
min Minuto.
ml Mililitro.
mM Milimolar.
M1 Patrón inmunofluorescente anti-mitocondrial tipo 1.
M5 Patrón inmunofluorescente anti-mitocondrial tipo 5.
PES Prueba estándar para sífilis.
PIT Prueba de inmovilización treponémica.
RIAs Radio inmuno assay. Radio inmuno ensayo de fase sólida.
RVVT Russell viper venom time. Tiempo de veneno de víbora de Russell.
SB Síndrome de Behcet.
sdDNA Acido desoxirribonucleico de cadena simple.
SS Síndrome de Sjögren.
TP Tiempo de protrombina.
TT Tiempo de trombina.
ug Microgramos.
ul Microlitros.
V volts.

VDRL Venereal Disease Reference Laboratory. Laboratorio de referencia de enfermedades venéreas.

1. R E S U M E N .

Recientemente se ha descrito una entidad patológica autoinmune que involucra la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos - como causante de daño a diferentes componentes del organismo. Dicha entidad que reúne una serie de características clínicas y de laboratorio, se le ha llamado síndrome de anti-fosfolípidos, el cual puede presentarse solo, denominandose "primario", o asociado con alguna otra enfermedad autoinmune como el LEG.

El síndrome de anti-fosfolípidos es una enfermedad de carácter multifactorial en la que intervienen elementos genéticos y ambientales, los cuales interactúan para producir la alteración.

En el presente estudio se analizó si los familiares de los pacientes con síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos "primario" y familiares de pacientes con LEG presentan anticuerpos anti-fosfolípidos, así como la posible participación del CPH en la -- susceptibilidad al síndrome de anti-fosfolípidos.

Los anticuerpos anti-cardiolipina se detectaron por la técnica de ELISA y los antígenos del sistema HLA fueron determinados por la técnica de microlinfocitotoxicidad utilizando un panel de antisueros. El factor B y C4 se estudiaron por electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa e inmunofijación con antisueros - específicos; el segundo componente del complemento C2 se determino mediante electroenfoque y un ensayo hemolítico funcional con un suero deficiente en C2.

Los resultados muestran que los familiares de pacientes con - síndrome de anti-fosfolípidos primario no presentaron anticuerpos anti-cardiolipina. El 8.02% de los familiares de pacientes

con LEG presentaron anticuerpos anti-fosfolípidos, y en algunos casos a títulos mayores a 5 D.E. En el síndrome de anti-fosfolípidos primarios se encontró una mayor frecuencia de pacientes de sexo femenino, mientras que pacientes masculinos presentan títulos de anticuerpos anti-fosfolípidos más altos.

En el estudio de las moléculas del CPH, se destaca el aumento en frecuencia del alelo nulo en C4A, preferentemente en el complotipo SC01 en los pacientes con el síndrome de anti-fosfolípidos primario. En los pacientes con LEG con anticuerpos anti-fosfolípidos positivos, también se encontró el alelo nulo en C4A aumentado en frecuencia. En pacientes con el síndrome de anti-fosfolípidos primario, el marcador DR7 se encontró aumentado en frecuencia con respecto a la población normal, mientras que en los pacientes con LEG este marcador no existe.

En conclusión, el trabajo nos permitió establecer la existencia de marcadores genéticos asociados al síndrome de anti-fosfolípidos primario, que son el alelo nulo en C4A preferentemente en el complotipo SC01 y el marcador DR7. Con el estudio genético del síndrome de anti-fosfolípidos primario y de pacientes con LEG, comparando los resultados reportados de EMTC, se propone que el síndrome es una entidad patológica particular.

2. INTRODUCCION.

El fenómeno de autoinmunidad es una respuesta inmune celular y/o humoral dirigida contra los componentes propios del organismo.

La autoinmunidad está marcada por una actividad excesiva o anormal de las células efectoras inmunitarias. Esta actividad puede incluir la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B y la infiltración de los tejidos, o su destrucción por los linfocitos T y macrófagos. Aunque se desconoce la etiopatología de las enfermedades autoinmunes, se sabe que ciertos factores pueden desencadenar la producción de autoanticuerpos. Por ejemplo, el uso prolongado de algunos fármacos como la hidrolazina, procainamida, alfa-metildopa, sedormide, estibofen, entre otras (1, 2, 3, 4, 5). También se cree que la exposición a rayos X o emisiones de tipo gamma, procesos inflamatorios, procesos infecciosos virales persistentes (Pox virus, Herpes, Epstein-Barr), infecciones bacteriana (por ejemplo Mycoplasma) y factores genéticos contribuyen al desencadenamiento de las enfermedades autoinmunes (6).

Las enfermedades autoinmunes se han clasificado en dos grupos: aquellas órgano específicas como la tiroiditis de Hashimoto y aquellas donde el órgano afectado es inespecífico alterando a la mayoría de los tejidos del individuo, como es el caso del lupus eritematoso generalizado (LEG).

De los diversos grupos de anticuerpos descritos en el LEG y desordenes autoinmunes relacionados, los anticuerpos anti-fosfolípidos habían recibido relativamente poca atención.

En la actualidad ha aumentado el interés, ya que se ha encontrado una fuerte correlación entre la presencia de estos anticuerpos con trombosis, trombocitopenia y pérdida fetal recurrente. Esta asociación no se limita a pacientes con LEG, ya que -- existen evidencias en donde un grupo de pacientes con estos trastornos forman un subgrupo diferentes de enfermedades autoinmunes denominadas recientemente como "Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos" (7, 8). El síndrome se caracteriza por los siguientes rasgos clínicos: trombosis arterial y/o venosa, trombocitopenia y prueba de Coomb's positiva, asociados con la presencia de anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) a títulos elevados. En otros estudios, también se ha asociado a los aCL con pacientes que cursan con migraña, livedo reticularis y corea (9). Los isotipos de los anticuerpos detectados en los pacientes son principalmente de tipo IgG e IgM (10, 11). La presencia de las manifestaciones clínicas a las que se asocian los anticuerpos anti-fosfolípidos, sin manifestaciones de otras enfermedades autoinmunes como LEG, en enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), etc., se le ha definido recientemente como síndrome de anti-fosfolípidos "primario" (8). Este aunado al diagnóstico de alguna enfermedad autoinmune, se denomina síndrome de anti-fosfolípidos secundario o asociado a la enfermedad autoinmune identificada.

Como se sabe, la respuesta inmunológica en el humano esta regulada por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6, denominado complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

Los genes que componen al CPH han sido clasificados en tres grupos en base a las proteínas que codifican. Los genes clase I estan formados por los loci HLA-A, B y C; los genes clase II por los loci HLA-DR, DP, y DQ y finalmente los genes clase III que codifican para tres proteínas del sistema del complemento (factor B, C2 y C4) y que se localizan entre los locus HLA-DR y el locus HLA-B. Los avances realizados en el conocimiento de la genética y la biología de las moléculas clase I, II y III y su participación en la regulación de la respuesta inmunológica, han fomentado la investigación entre la asociación de enfermedades autoinmunes y alelos de estos genes (12, 13).

Debido a que el CPH es el sistema genético humano más polimórfico, en el presente trabajo se estudia el aspecto genético del síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos en relación a los genes de dicho complejo, considerando que existe predisposición a la enfermedad por la presencia de algún marcador genético. De los genes con mayor posibilidad de participación, se encuentran las moléculas clase III, que como ya se menciona son las proteínas del complemento.

3. GENERALIDADES

3.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

Los anticuerpos anti-cardiolipina fueron reportados por primera vez en 1906, cuando Wasserman describió una prueba de fijación de complemento para detectar reagina, en el suero de pacientes con sífilis (14). Durante las siguientes tres décadas, se utilizó una variedad de tejidos normales que por extracción con solventes orgánicos (alcohol), sirvieron como fuente de material antigénico para detectar reagina en pruebas como fijación de complemento (Wasserman, Kahn) y floculación (Price, Hinton, Venereal - Disease Reference Laboratory (VDRL)). En 1941, Pangborn (15) demostró en extracciones con alcohol de músculo de corazón de buey, que el antígeno unido por la reagina es un fosfolípido ácido que posteriormente fue llamado cardiolipina.

Por estudios en personal militar y no militar durante la Segunda Guerra Mundial, se identificaron individuos con pruebas positivas para sífilis sin evidencias clínicas de la enfermedad (16). El desarrollo de la prueba de inmovilización treponémica (FIT) - en 1949 por Nelson (17), permitió la identificación entre pacientes con pruebas verdaderamente positivas y falsa positiva para sífilis (17). En un estudio retrospectivo Moore y Mohr (16) encontraron dos grupos de pacientes, aquellos con pruebas falsa positiva transitoria (usualmente como resultado de la infección intercurrente) y un segundo grupo de individuos que eran positivos persistentes por largos períodos de tiempo. Este último grupo fue identificado como reactores crónicos biológicamente falsos positivos (BFP), definidos como individuos sin evidencias -

clínicas o epidemiológicas de sífilis pero que tenían en repetidas ocasiones prueba estandar para sífilis (PES) positiva y presentaban de igual manera PIT negativa por seis meses o más.

Existe una alta prevalencia de enfermedades autoinmunes en pacientes con PES-BFP crónica incluyendo individuos con LEG, Síndrome de Sjögren (SS), anemia hemolítica autoinmune (AHA), tiroiditis de Hashimoto y artritis reumatoide (AR) (16). Un estudio prospectivo demostró que pacientes con PES-BFP crónica pueden prece - der a manifestaciones clínicas de desordenes autoinmunes por va - rios años (14, 18, 19, 20, 21, 22, 23). También se demostró que - pacientes con PES-BFP tienen una alta frecuencia de otros auto - anticuerpos, particularmente anticuerpos antimucleares (AAN), en un 40-50% (14, 24).

Durante los años 50's, mientras el interés por pacientes PES-BFP iba en aumento, se describieron dos casos de pacientes con - LEG que presentaban desórdenes hemorrágicos y tiempos prolonga - dos de protrombina y coagulación de sangre total con PES-BFP (25). En base a lo anterior, se pensó en una posible relación entre an - ticoagulantes circulante y PES-BFP. Posteriormente se dio la pri - mera descripción del anticoagulante circulante. En 1955 se des - cribió en una mujer con características clínicas de LEG, la pre - sencia de anticoagulante circulante y PES-BFP. Además, su bebé - presentó anticuagulante circulante por tres meses y PES-BFP por seis meses posteriores al nacimiento (26).

En un trabajo desarrollado en 1957, se mostró que la cardio - lipina prese. ca en el antígeno de Kahn puede absorber la activi

dad anticoagulante lúpica (27).

Originalmente, el anticoagulante lúpico (AL) se asoció a hemorragias, debido a que cuando se encontraba presente se aumentaban los tiempos de coagulación "in vitro". Sin embargo, rápidamente surgieron evidencias de que anomalías hemorrágicas en pacientes con AL son raras. Cuando se presentan hemorragias por lo general se deben a la presencia de trombocitopenia o hipoprotrombinemia, lo cual ocurre frecuentemente en pacientes con AL (28, 29, 30). Paradójicamente el AL se ha asociado a trombosis (7, 31, 32, 33, 34, 35, 36).

La asociación de anticoagulante lúpico con trombosis, trombocitopenia y pérdida fetal recurrente, ha ido en aumento por el avance en los conocimientos clínicos en los que han centrado su investigación los Hospitales Hammersmith y St. Thomas de Londres, así como en la búsqueda de técnicas más confiables y sensibles para detectar y caracterizar al anticuerpo (37). Dada la asociación del anticoagulante lúpico con la PES-BFP y la demostración de una reacción cruzada de estos anticuerpos con fosfolípidos -- por técnicas de difusión doble en agar (38), se han empleado las técnicas de radioinmuno ensayo de fase sólida (RIAs) y Enzyme -- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para detectar anticuerpos -- anti-cardiolipina (39, 40). Estudios iniciales y trabajos subsecuentes, han mostrado una estrecha relación entre anticuerpos -- anti-cardiolipina detectados por RIAs y ELISA y anticoagulante lúpico (39, 40, 41, 42, 43).

3.2 ANTICOAGULANTE LÚPICO

La característica más distintiva del anticoagulante lúpico, es su poder de prolongación de las pruebas de coagulación dependiente de fosfolípidos (30, 44).

El anticoagulante lúpico actúa a nivel del complejo activador de la protrombina en la cascada de la coagulación figura (1), -- causando con esto una prolongación del tiempo de activación de la tromboplastina parcial (APTT evalúa vía extrínseca), tiempo de veneno de víbora de Russell (RVVT evalúa factores VII y X), con menor frecuencia, prolongación del tiempo de protrombina (TP evalúa vía extrínseca y anticoagulante circulantes) manteniéndose el tiempo de trombina con valor normal (TT evalúa fibrinógeno). Los resultados anteriores sugieren que el anticoagulante lúpico no tiene efecto en la vía extrínseca o intrínseca hasta la activación del factor X. Un tiempo de trombina normal sugiere que el anticoagulante no actúa en puntos posteriores de la cascada. El hecho de que el efecto del anticoagulante lúpico no se debe a la deficiencia de los factores de la cascada, se demuestra porque el tiempo parcial de tromboplastina, que se encuentra aumentado, no se corrige con la adición de un volumen igual de plasma normal pobre en plaquetas. En la prueba de adición de plasma normal, la inhibición del APTT es inmediata y no se incrementa progresivamente con el tiempo de incubación, como sucede con anticoagulantes que inhiben factores específicos de la cascada, por ejemplo, anticuerpos anti-factor VIII (30). Diversos estudios han -- mostrado que el anticoagulante lúpico es una inmunoglobulina de

CASCADA DE LA COAGULACION

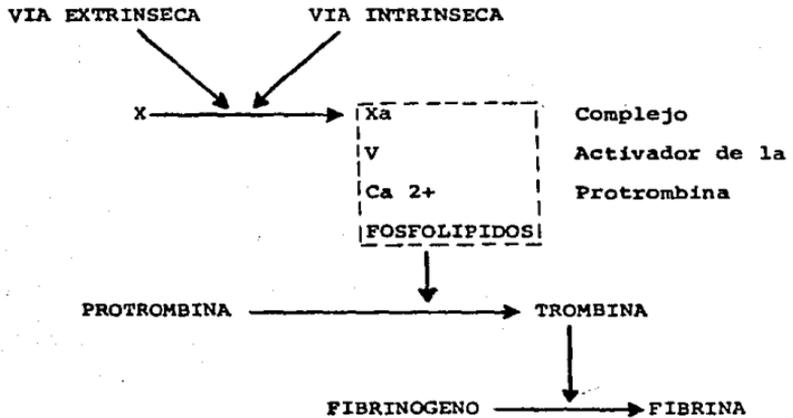


Figura (1). El anticoagulante lúpico actúa a nivel del complejo activador de la protrombina. Se une a la porción fosfolipídica del complejo inhibiendo la conversión de protrombina a trombina.

las clases IgG y/o IgM (45, 46).

Aún cuando el mecanismo por el cual el anticoagulante lúpico inhibe la acción del complejo activador de la protrombina se desconoce, se cree que interactúa de alguna manera con la porción fosfolípica del complejo (30, 44, 47, 48). Existen importantes evidencias que muestran el anticoagulante lúpico es un anticuerpo anti-fosfolípido. Thiagarajan (38), mediante la técnica de Ouchterlony, mostró que anticuerpos monoclonales IgM con actividad anticoagulante lúpica de un paciente con macroglobulinemia de Waldenström reaccionó cruzada con fosfolípidos de carga negativa. En un estudio subsecuente se encontró que la fracción gamma-globulínica de pacientes con AL, presentó reacción cruzada con fosfolípidos de carga negativa. Mediante micelas de fosfatidilserina-colesterol-fosfatidilcolina purificaron IgG policlonal de pacientes positivos para AL y demostraron que dichas preparaciones de anticuerpos tienen actividad anticoagulante lúpica (30, 49). Estudios realizados con anticuerpos anti-cardiolipina apoyan lo anterior. Pacientes con AL, estudiados por Harris (39), presentaron niveles de anticuerpos anti-cardiolipina IgG y/o IgM -- elevados, detectados por RIAs. Se ha encontrado una fuerte correlación entre el grado de positividad de la prueba de anticoagulante lúpico y el grado de elevación de los niveles de IgG anti-cardiolipina (41). Los anticuerpos anti-cardiolipina, así como el anticoagulante lúpico, tienen reacción cruzada con fosfolípidos de carga negativa (42, 43). Los anticuerpos IgG e IgM anti-cardiolipina purificados por afinidad, mostraron -

actividad anti-coagulante. Además, las asociaciones clínicas del anticoagulante lúpico y los anticuerpos anti-cardiolipina son -- las mismas, es decir, trombosis, trombocitopenia y pérdida fetal recurrente (39). Los anticuerpos anti-cardiolipina detectados por RIAs y el anticoagulante lúpico probablemente tienen la misma o muy similares especificidades.

3.3 ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA

Los anticuerpos anti-cardiolipina han sido detectados por técnicas de ELISA y RIAs, donde principalmente se emplean fosfolípidos de carga negativa como la fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol (39, 42, 43, 50).

Existen evidencias de que dichos antígenos son reconocidos -- también por el anticoagulante lúpico, sin embargo, aún se discuten dichos puntos.

Una de las preguntas más controversiales con respecto a los anticuerpos anti-fosfolípidos, es su relación con anticuerpos anti-DNA. Diversos estudios con anticuerpos monoclonales anti-DNA obtenidos de hibridomas de ratón-ratón (51, 52) e hibridomas humano-humano (53), han mostrado una reacción cruzada con cardiolipina. En otros estudios se ha visto que anticuerpos monoclonales anti-cardiolipina obtenidos de hibridomas ratón-ratón (54) muestran reacción cruzada con DNA. Al parecer, la reactividad cruzada se debe a las uniones fosfodiéster del DNA y la región polar de la cardiolipina (55). Esto podría explicar parcialmente el amplio rango de anticuerpos encontrados en el LEG por la propuesta de un antígeno virtualmente presente siempre, de tal forma que un

fosfolípidos de carga negativa puede estimular la formación de anticuerpos con especificidades aparentemente diferentes, pero con reconocimiento tanto de DNA como de fosfolípidos (56).

En estudios realizados en pacientes con LEG del INNSZ y reportes de otros autores como Harris E. N., Gharavi A. E. y Hughes G. R. V., se encontró que pacientes con niveles elevados de anticuerpos anti-cardiolipina (por arriba de 5 desviaciones estándar) pocas veces tienen niveles altos de anticuerpos anti-DNA de cadena doble (cdDNA) y/o simple (csDNA) (39, 42).

En un estudio de 10 pacientes con niveles de anticuerpos anti-cardiolipina muy elevados, los anticuerpos anti-cardiolipina inhibieron la actividad de unión con cardiolipina en los mismos, el DNA de cadena doble y de cadena sencilla, inhibieron la actividad de unión a cardiolipina en sólo 2 de los 10 pacientes probados. En otros 10 pacientes con niveles altos de anticuerpos anti-dcDNA y anti-csDNA, los cdDNA y csDNA inhibieron marcadamente la unión a cdDNA y csDNA, no ocurriendo de esta manera con cardiolipina (42).

Otro de los estudios que apoya que no existe reacción cruzada entre anticuerpos anti-DNA y anticuerpos anti-cardiolipina, fue realizado por Harris y colaboradores en 1985, quienes purificaron por afinidad los anticuerpos policlonales anti-cardiolipina de 5 individuos. El purificado no reconoció dcDNA ni csDNA.

De la misma manera, se purificaron anticuerpos policlonales anti-csDNA de 2 individuos, este purificado tampoco reconoció cardiolipina (43). Por último, manifestaciones patológicas ---

como trombosis, trombocitopenia y pérdida fetal recurrente se asocian a anticuerpos anti-cardiolipina, no así a anticuerpos anti-DNA (39).

Las cargas solas no son suficientes para explicar la unión de los anticuerpos anti-cardiolipina a los fosfolípidos de carga negativa, ya que el anticuerpo no reconoce fosfatidilglicerol ni ácido hialurónico (43). El hecho de que el anticuerpo anti-cardiolipina no reconozca al fosfatidilglicerol, sugiere que la porción del ácido es esencial para su antigenicidad (figura 2).

Los estudios de Inove y Nojima (57, 58) muestran que los anticuerpos anti-cardiolipina se unen a las cargas negativas de los grupos fosfodiéster de la cardiolipina, y la porción glicerida de la molécula es esencial para que ocurra la unión. La sustitución de la porción glicerida de la molécula de cardiolipina por un anillo bencílico, provoca una disminución de la antigenicidad (figura 2). De lo anterior se propone que los anticuerpos anti-cardiolipina se unen a la molécula no sólo por las cargas negativas de los grupos fosfodiéster (como los del DNA) sino que más este debe estar en la forma de fosfolípido.

La relación entre anticuerpos anti-cardiolipina detectados por RIAs y ELISA, los anticuerpos detectados por la PES-BFP y la reagina (el anticuerpo presente en sífilis) es difícil de explicar. Dos estudios muestran que no existe relación entre niveles de anticuerpos anti-cardiolipina y títulos de VDRL (42, 59, 60). Sin embargo, se ha encontrado que algunos sueros de pacientes sífilíticos (con reagina) presentan una baja unión a cardio-

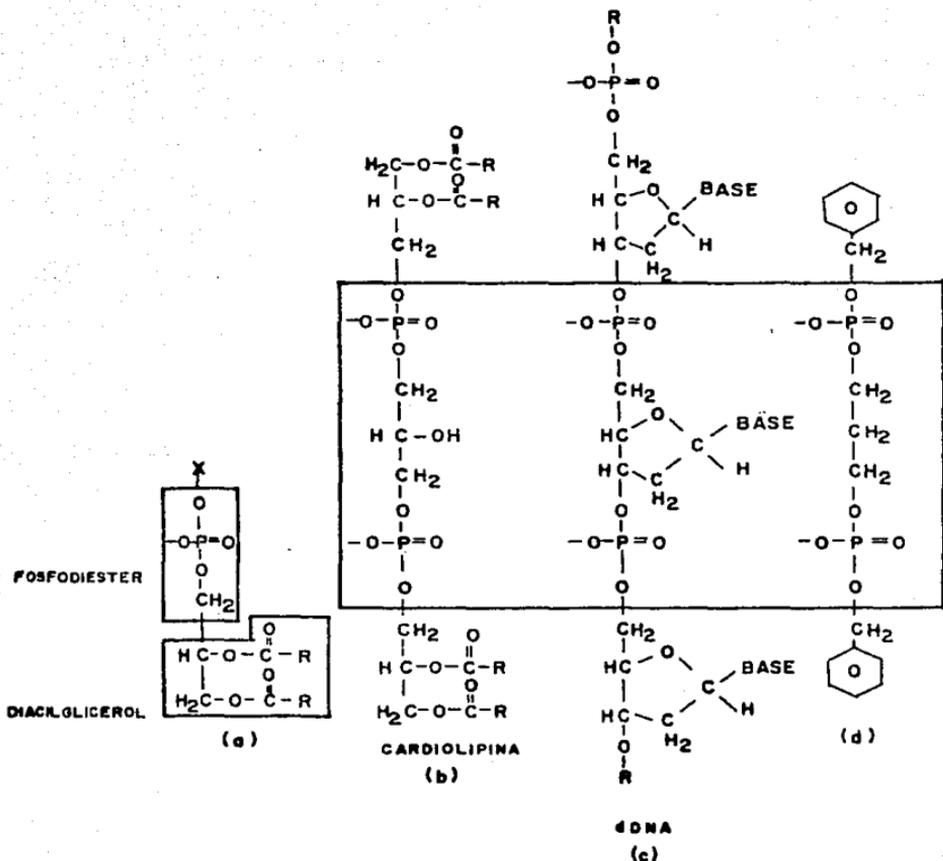


Figura 2

COMPARACION DE 4 ESTRUCTURAS CON GRUPOS FOSFODIESTER DE CARGA NEGATIVA

- a) Molécula básica de fosfolípido.
- b) Molécula de cardiolípina.
- c) Enlace fosfodiéster del DNA.
- d) Análogo sintético de cardiolípina, donde la porción glicerida de la molécula está sustituida por anillos bencílicos.

lipina en prueba de RIAs y ELISA, y cuando existe un alto reconocimiento, es usualmente debido a inmunoglobulinas clase IgM. Por otro lado, reactores BFP invariablemente tienen altos niveles de anticuerpos anti-cardiolipina (42), pero títulos bajos en la prueba de VDRL (59), lo que sugiere que la reagina, el anticuerpo -- presente en sífilis, es diferente de los anticuerpos responsables de la PES-BFP, así como de los anticuerpos anti-cardiolipina detectados por RIAs y ELISA, y diferente también del anticoagulante lúpico. La hipótesis anterior se apoya en el trabajo de Jahngson y Lassus (62) que muestra que la actividad anticoagulante se detecta sólo en el suero de pacientes con una reacción PES-BFP, pero no en suero de pacientes con sífilis. Además, se encontraron diferencias entre los patrones fluorescentes de anticuerpos anti-mitocondriales de sueros de pacientes con sífilis (patrón M1) y sueros de pacientes PES-BFP (patrón M5) (63, 64).

3.4 ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS.

3.4.1 FRECUENCIA

En diversos estudios, la frecuencia del anticoagulante lúpico se reporta como de 6-24% en los pacientes con LEG (30, 47). Las variaciones en la sensibilidad de la prueba para detectar el anticoagulante lúpico hacen que la frecuencia sea difícil de establecer (30, 65).

El anticoagulante lúpico no se limita a pacientes con LEG, se ha descrito también en otros padecimientos autoinmunes inducidos por fármacos y desórdenes infecciosos (28, 29, 33, 34, 66).

De 167 pacientes con LEG estudiados para anticuerpos anti-car-

diolipina de la clase IgG, se encontró que 82 (42%) presentaron títulos elevados (41, 67). El estudio anterior concuerda con el trabajo realizado en 500 pacientes con LEG estudiados en el Departamento de Inmunología y Reumatología del INNSZ. Los anticuerpos anti-cardiolipina de la clase IgG han sido detectados también en otros desórdenes autoinmunes como síndrome de Sjögren primario, enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), artritis reumatoide (AR), púrpura trombocitopenica idiopática, síndrome de Behcet (SB), miastenia gravis y desórdenes autoinmunes no definidos. Altos niveles de anticuerpos anti-cardiolipina de la clase IgM están más ampliamente distribuidos que los anticuerpos anti-cardiolipina de la clase IgG y se han encontrado en autoinmunidad inducida por fármacos y en desórdenes infecciosos incluyendo algunos pacientes con sífilis. Niveles muy altos de IgG anti-cardiolipina (mayores a 5 desviaciones estándar por arriba de la media normal) están relativamente restringidos a pacientes con LEG, pacientes con síndrome de anti-fosfolípidos "primario" y un pequeño número de pacientes con otros desórdenes autoinmunes.

3.4.2 TROMBOSIS

Diversos centros en todo el mundo han encontrado episodios trombóticos prevalecientes en pacientes con anticuerpos antifosfolípidos (32, 43). En un estudio completo de pacientes con una amplia variedad de niveles de anticuerpos anti-cardiolipina de la clase IgG, mostraron que la prueba es altamente predictiva para trombosis a niveles altos del anticuerpo (10, 68).

La trombosis puede ocurrir en cualquier parte del sistema vascular. La trombosis de las venas superficiales y profundas de las piernas se reporta con mayor frecuencia (32); también existen reportes de trombosis de las venas renales, de la vena cava inferior y de las venas suprahepáticas que se manifiesta como síndrome de Budd-Chiari e hipertensión pulmonar debida a embolia múltiple o trombosis de los vasos pulmonares (69). En la circulación arterial, se reportan frecuentemente los ataques de isquemia (32). También existen reportes de infartos al miocardio (70, 71, 73) y trombosis de las arterias que abastecen los miembros superiores e inferiores, las vísceras abdominales y la retina. Los pequeños vasos sanguíneos de los glomérulos (70) y de la placenta también son sujetos de proceso trombóticos (73, 74, 75).

La asociación de anticuerpos anti-fosfolípidos con trombosis es independiente de la presencia del LEG u otras enfermedades -- autoinmunes definidas (10). Esta afirmación se apoya en la detección de anticuerpos anti-cardiolipina en 13 de 62 sobrevivientes de infarto al miocardio menores de 45 años (71), ninguno de los cuales tienen desórdenes autoinmunes definidos. Ocho pacientes -- con niveles altos de anticuerpos anti-cardiolipina continuamente presentaron episodios de problemas cardiovasculares durante 36 a 64 meses de seguimiento (71, 76). Existen pocos hallazgos que explican la naturaleza de la unión entre anticuerpos anti-fosfolípidos y trombosis. La hipótesis más difundida, basada en los trabajos de Carreras y colaboradores (73, 77), propone que los anticuerpos pueden inhibir la producción de prostaciclina por las -

células endoteliales provocando un incremento en la agregación - plaquetaria y, por lo tanto, trombosis. Más recientemente, en un estudio de tres pacientes con anticoagulante lúpico, se muestra que el plasma de estos individuos inhibe la actividad precalicreina y por lo tanto la fibrinólisis (75, 78). Por otro lado, se cree que los anticuerpos anti-fosfolípidos pueden unirse a los fosfolípidos de las células endoteliales, produciéndoles daño que redundaría en la disminución de la liberación del complejo activador del plasminógeno (79). Otra posibilidad es que los fosfolípidos pueden unirse a la membrana de las plaquetas y provocar la agregación formando trombos. También se ha encontrado que la fracción IgG de pacientes con anticuerpos anti-cardiolipina, puede inhibir a la trombomodulina (80). Esta proteína, cuando es unida por la trombina, activa a la proteína C, que es un importante anticoagulante endógeno. Un estudio reciente sugiere que los anticuerpos anti-cardiolipina puede neutralizar el efecto que incrementa la activación de la proteína C por los fosfolípidos en la formación del complejo trombina-trombomodulina.

Todos los mecanismos que proponen la asociación de anticuerpos anti-fosfolípidos con trombosis, asumen que estos anticuerpos están involucrados directamente en los procesos trombóticos, pero existen muchas preguntas aún sin contestar. Por ejemplo, no todos los pacientes con anticuerpos anti-fosfolípidos tienen trombosis. Una respuesta parcial a lo anterior, es que por razones que no se conocen, la trombosis parece ocurrir principal --

mente en pacientes con niveles moderados y altos de IgG anti-cardiolipina (10). Estudios realizados en el INNSZ apoyan lo anterior. Por otro lado, los pacientes que presentan solamente IgM anti-cardiolipina elevada, aun cuando el anticuerpo tiene actividad anticoagulante lúpica, no parecen ser propensos a las complicaciones clínicas asociadas a los anticuerpos anti-fosfolípidos (81, 82). Se ha encontrado recientemente un pequeño número de pacientes con niveles elevados de anticuerpos anti-cardiolipina - IgM e IgA que tienen historias de pérdida fetal recurrente y --trombosis (83). Aun cuando se acepta que la IgG anti-cardiolipina juega un papel importante en la trombosis, es necesario explicar por que sólo algunos pacientes tienen repetidamente niveles elevados de anticuerpos anti-cardiolipina sin complicaciones.

3.4.3 PERDIDA FETAL

Abortos espontáneos repetidos y muerte intrauterina en presencia y ausencia de LEG, parecen también ser una de las manifestaciones mayores del síndrome de anti-fosfolípidos (84, 85). Mientras que el anticoagulante lúpico se había asociado con el riesgo aumentado de pérdida fetal, algunos trabajos apoyan que la -determinación de los niveles de anticuerpos anti-cardiolipina - por RIAs o ELISA son los métodos más sencibles comunmente usados para la predicción de peligro o muerte fetal en embarazadas con LEG (85). Lo anterior sugiere que el mismo método de detección puede ser usado en el seguimiento de mujeres con abortos recurrentes que no tienen LEG.

Las anomalías vasculares placentarias estudiadas incluye

trombosis, que fue observada principalmente en pacientes con LEG, por lo tanto, se cree que los anticuerpos anti-cardiolipina inducen trombosis vascular placentaria, pudiendo ser esta la responsable del alto riesgo de pérdida fetal en aquellos pacientes que tienen altos niveles del anticuerpo. En un trabajo se reportan - placentas pequeñas de acuerdo a la edad gestacional y al peso - del feto, lo que sugiere que los anticuerpos anti-cardiolipina se unen a los fosfolípidos antigénicos de la placenta, pudiendo en algunos casos ser capaces de inhibir el crecimiento placenta - rio y en otros inhibir el paso de nutrientes a través del órga - no (85).

3.4.4 TROMBOCITOPENIA Y PRUEBA DE COOMB'S POSITIVA

En pacientes con anticuerpos anti-fosfolípidos es frecuente encontrar una cuenta plaquetaria baja (10, 86, 87). No obstante, un conteo de plaquetas lo suficientemente bajo para causar una hemorragia es relativamente poco frecuente, por lo que es reco - mendable siempre realizar un conteo de plaquetas en pacientes con anticoagulante lúpico que presentan hemorragias (30). La - prueba de Coomb's positiva es frecuente en pacientes con anti - cuerpos anti-fosfolípidos a niveles elevados, y algunos traba - jos apoyan que la anemia hemolítica también se ha encontrado -- asociada a niveles altos de anticuerpos anti-fosfolípidos (88).

Los mecanismos por los cuales ocurre la trombocitopenia aún no se conocen. Es muy posible que los anticuerpos anti-fosfolí - pidos se unan a los fosfolípidos de la membrana plaquetaria pro - vocando la destrucción de dichas células. Alternativamente, los

anticuerpos unidos a las plaquetas pueden incrementar el reconocimiento y destrucción de las plaquetas por el sistema reticulo-endotelial. De la misma manera, los anticuerpos anti-fosfolípidos pueden unirse por reacción cruzada a los fosfolípidos de la membrana de los eritrocitos provocando su destrucción, lo cual da una prueba de Combs' positiva.

3.4.5 DESORDENES VASOSPASTICOS

El livedo reticularis es un problema de la piel que se relaciona con vaso constricción anormal; recientemente se ha asociado con niveles elevados de anticuerpos anti-cardiolipina (89). El livedo reticularis es causado por acumulación de sangre en los vasos capilares de la piel y venulas que se encuentran dilatadas, generalmente se presenta en las extremidades y en el tronco. --- Hugues y colaboradores propusieron originalmente la existencia de una relación entre pacientes con LEG que desarrollan livedo reticularis con niveles elevados de anticuerpos anti-cardiolipina (90). Weinstein y colaboradores confirmaron dicha relación. La asociación de los anticuerpos anti-cardiolipina a títulos elevados con livedo reticularis en el estudio de pacientes con LEG, sugiere que el livedo reticularis en dicha enfermedad es secundario a los procesos trombóticos que hacen que los vasos sanguíneos de la piel sean aparentes. Estudios de biopsias de las lesiones son necesarios para confirmar lo anterior.

Otros trabajos realizados sugieren que los anticuerpos anti-fosfolípidos pueden estar patogenéticamente relacionados con la enfermedad de Sneddon (asociación de livedo reticularis con hi-

pertensión inestable y anomalías neurológicas). La oclusión de la arteria retinal central se reportó recientemente en pacientes que presentan la enfermedad de Sneddon, los cuales son positivos para la presencia de los anticuerpos anti-fosfolípidos.

3.4.6 DESORDENES NEUROLÓGICOS

Un número importante de síndromes neurológicos ocurre en asociación con anticuerpos anti-fosfolípidos (91, 92). La trombosis cerebrovascular en pacientes con LEG, tiene una fuerte asociación con la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (92). Ataques transitorios de isquemia y aneurisma fugax se han descrito también en estos pacientes. Algunos casos de problemas neurológicos no trombóticos como corea, epilepsia, neuropatía de Jamaica, mielitis transversa (esclerosis lúpica), síndrome de -- Guillain-Barre y migraña, también se han asociado con la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (90, 93). El papel patogénico de los anticuerpos anti-fosfolípidos en estas condiciones, sugiere una potencial reactividad cruzada con fosfolípidos del sistema nervioso central (90, 94).

3.4.7 HIPOCOMPLEMENTEMIA

En estudios recientes se ha encontrado asociación entre anticuerpos anti-cardiolipina e hipocomplementemia, y una asociación similar entre actividad anticoagulante lúpica y bajos niveles - de C4, pero no de C3 (95). Existen pocas publicaciones de estudios que examinan niveles de complemento y anticuerpos anti-cardiolipina positivos o anticoagulante lúpico positivo con o sin

LEG, Schleider y colaboradores (25) no encontraron asociación -- con niveles de complemento en 58 pacientes con anticoagulante lú

gico; no obstante, solo 16 tenían LEG. Norberg y colaboradores - (96) encontraron que algunos anticuerpos anti-mitocondriales del tipo M5, fueron reactivos con cardiolipina y bajos niveles de C4. Los trabajos de Hazeltine y colaboradores (95) sugieren que la asociación de anticuerpos anti-cardiolipina y el anticoagulante lú

gico con hipocomplementemia, es independiente de la actividad del LEG.

La etiología de la hipocomplementemia en pacientes con LEG es probablemente multifactorial, refleja una síntesis hepática - baja y un hipercatabolismo secundario por la activación del complemento, debido a la formación de complejos inmunes circulantes (CIC). Se puede sumar a los factores la asociación del anticoagu

lante lú

gico e hipocomplementemia, que proveen evidencias indi - rectas de otros mecanismos que contribuyen con el estado de hipo

complementemia. En 1959, Loeliger demostró que un cofactor en el plasma normal incrementa la acción del anticoagulante lú

gico (97). En 1965, Yin y colaboradores (98) postularon que el cofactor era una gammaglobulina, pero un estudio detallado hecho por Rivar, - Schiffman y Rappaport (99) mostró que el cofactor era inestable a 56°C por 30 minutos, se absorbe en forma mínima con sulfato de bario e hidróxido de aluminio, tiene un peso molecular de 200 000, y es precipitable con sulfato de amonio al 50-70%. Las caracterís

ticas descritas son similares a las del complemento. Basados en estos datos, Hazeltine y colaboradores postulan que en los pacien

tes con anticuerpos anti-cardiolipina y actividad anticoagulante lúpica, el complemento puede ser activado y funcionar como cofactor que potencializa la actividad anticoagulante lúpica, lo que contribuye al estado de hipocomplementemia (95). La falta de asociación entre anticoagulante lúpico y C3 no necesariamente contradice la hipótesis, ya que C3 es considerado un reactivo de fase aguda, y sus niveles no siempre reflejan el grado de consumo del complemento. La medición de C4 es considerada un marcador más sensible, de menos episodios de activación del complemento "in vivo" y el anticoagulante lúpico y la cardiolipina están asociados con bajos niveles de C4.

3.5 SINDROME DE ANTICUERPOS-FOSFOLIPIDOS

La existencia de un posible "síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos" es aún debatible. No obstante, la combinación de trombosis arterial y/o venosa, pérdida fetal recurrente, trombocitopenia y prueba de Coomb's positiva, ocurre frecuentemente en pacientes con anticuerpos anti-cardiolipina (8, 117).

Uno de los estudios que más apoyan la existencia del síndrome es el llevado a cabo por Harris y colaboradores. En 121 pacientes con anticuerpos anti-cardiolipina divididos en tres grupos: positivos altos, positivos bajos y normales, se determinó la distribución de pacientes con algunas combinaciones de 4, 3, 2, 1 o ninguna de las siguientes características: trombosis, pérdida fetal recurrente, trombocitopenia y prueba de Coomb's positiva. 21 pacientes con 3 o 4 características clínicas estuvieron en el grupo de anticuerpos anti-cardiolipina, positivos altos (16/21) y posi-

tivos bajos (5/21). En el otro extremo, estuvieron los individuos con ninguna complicación de las mencionadas, el grupo normal -- (18/34) o positivos bajos (12/34), sólo 4 de 45 pacientes estuvieron en el grupo positivo alto sin tener ninguna de las características clínicas. Existe una fuerte correlación estadística entre anticuerpos anti-cardiolipina de clase IgG y el número de características clínicas ($p < 0.001$). Los hallazgos son importantes cuando se evalúan pacientes con altos niveles de IgG anti-cardiolipina que pueden desarrollar trombosis, pérdida fetal o trombocitopenia (10). Los estudios realizados con anticuerpos anti-fosfolípidos sugieren que migraña, livedo reticularis y corea pueden también formar parte del síndrome, pero necesita aún ser demostrado en forma contundente.

3.6 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El complejo principal de histocompatibilidad está formado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano (100, 101, 102). Estos genes han sido clasificados en tres grupos en base a la proteína que codifican.

Los genes clase I están constituidos por los loci HLA-A, B y C que codifican para una proteína que se encuentra en la superficie de todas las células nucleadas (102, 103) y, que se ha relacionado con el reconocimiento de células infectadas por virus, activación de células T y rechazo de injertos (104). La proteína está formada por dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente y de peso aproximado de 43 000 y 12 000 daltons. La cadena

ligera es una beta-2-microglobulina no polimórfica y que es codificada por un gen localizado en el cromosoma 15; la cadena pesada es un polipéptido glicosilado que es codificado por los alelos HLA-A, B y C que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 humano y que es la que da el elevado polimorfismo.

Los genes clase II, formados por los loci HLA-DR, DP y DQ, codifican, por su parte, antígenos de superficie que tienen una distribución muy restringida en cuanto al tipo de células que las expresan, se localizan en los linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados y células endoteliales; estos antígenos se han relacionado con la cooperación celular (105) y están formados por dos cadenas polipeptídicas glicosiladas alfa y beta unidas no covalentemente y de peso aproximado de 33 000 y 28 000 daltons respectivamente. El polimorfismo de estas moléculas reside únicamente en la cadena beta.

Por último, los genes clase III son un grupo formado por cuatro genes que codifican para dos proteínas de la vía clásica del complemento (C2 y C4) y una de la vía alterna (factor B), teniendo la característica de que el gen que codifica para C4 se encuentra por duplicado (C4A y C4B), con una longitud de aproximadamente 120 kilobases (Kb) del brazo corto del cromosoma 6 humano.

El C4 es una glicoproteína, cuya estructura fue caracterizada en 1963 como una beta-1-globulina con un peso aproximado de 200 mil daltons. En 1974, Scheiber y Muller demostraron que C4 está formado de tres subunidades unidas por puentes disulfuro, la al

fa, beta y gamma cuyos pesos son 98 000, 78 000 y 33 daltons respectivamente (106).

El segundo componente del complemento (C2) ha sido uno de los componentes más difíciles de obtener, ya que se presenta en el suero en concentraciones muy bajas (15-20 mg/ml) y es sumamente vulnerable a la proteólisis durante su obtención. La proteína es formada por una cadena única de peso molecular aproximado de 100 000 daltons que durante su activación se divide en dos cadenas no unidas por puentes disulfuro y de peso molecular de 70 000 y 30 000 daltons; la proteína activa puede ser una proteasa con el sitio catalítico en la cadena más pesada.

Debido a la cercanía de todos estos genes, se ha observado -- que la recombinación entre cromosomas homólogos ocurre con una -- muy baja frecuencia, heredándose todo el grupo de genes en bloque (figura 3).

El CPH juega un papel muy importante desde el punto de vista biológico debido a la cantidad y trascendencia de sus funciones en el organismo. Algunas de estas funciones son: 1) regulación de la producción de anticuerpos humorales; 2) regulación de la producción de células T de ayuda; 3) regulación de ciertas funciones de la respuesta inmune; 4) regulación de la reacción de injerto contra huésped; 5) biosíntesis de componentes del complemento; 6) vigilancia inmunológica; 7) marcadores para la identificación de genes involucrados en la patogénesis de varias enfermedades, sobre todo de enfermedades autoinmunes; y 8) regulación de la embriogénesis ; y 9) regulación de la síntesis y niveles de hormonas esteroides.

MAPA FISICO DE LA REGION HLA HUMANO

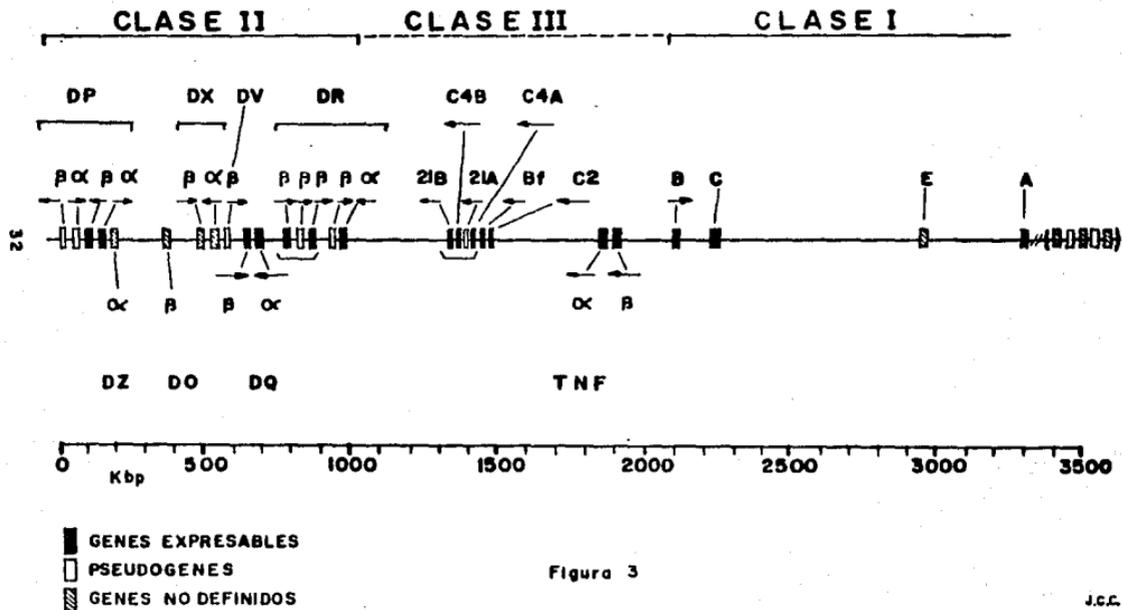


Figura 3

3.6.1 SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El sistema del complemento está formado por una serie de proteínas plasmáticas, que están presentes como precursores inactivos. Estos se activan gracias a un conjunto de reacciones bioquímicas que involucran rupturas proteolíticas.

Se han obtenido y caracterizado 19 componentes de este sistema, los cuales se muestran en la tabla 1 con sus pesos moleculares, concentraciones y fragmentos en los que se dividen durante su activación.

Las proteínas del sistema del complemento juegan un papel muy importante en la generación de la respuesta inflamatoria normal y en las defensas del huésped contra una gran variedad de microorganismos. Esas actividades, son producidas por una serie de reacciones altamente complejas que involucran proteólisis limitada e interacciones específicas proteína-proteína.

La activación de los componentes del complemento promueve también la contracción del músculo liso, la quimiotaxis de neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos, además de la inmunoadherencia de fagocitos. Otros efectos de la activación de este sistema incluyen: solubilización de complejos inmunes y neutralización de virus. La tabla 2 muestra algunos efectos que resultan de la activación del sistema.

3.6.2 DEFICIENCIA DE COMPONENTES DEL COMPLEMENTO

Estudios a este respecto han revelado que deficiencias de componentes específicos del complemento, pueden predisponer al desarrollo de ciertas enfermedades. Existen deficiencias hereda-

TABLA 1.

CARACTERISTICAS DE LOS 19 COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.

Nombre	Peso Molecular	Concentración en suero ug/ml.	Fragmentos
Vía Clásica			
Clq	400,000	70	
Clr	95,000	35	
Cls	85,000	35	
C4	180,000	400	C4a, C4b, C4c, C4d
C2	117,000	25	C2a, C2b
Vía Alterna			
C3	185,000	1500	C3a, C3b, C3c, C3d
B	95,000	250	
D	25,000	2	
P	220,000	25	
Vía Efectora Común			
C3	185,000	1500	
C5	200,000	85	C5a, C5b
C6	28,000	75	
C7	121,000	55	
C8	153,000	55	
C9	80,000	200	
Proteínas de Control			
Inhibidor de C1	105,000	180	
Proteína que une C4	1.2-1.5X10 ⁶	250	
I (inactivador de C3b/C4b)	90,000	50	
H (beta 1H)	150,000	400	

TABLA 2.

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.

Actividad	Componentes
1. Incremento de la fagocitosis (opsonización)	C3b
2. Neutralización viral	C1 y C4b
3. Iniciación de la lisis viral	C1q
4. Aumento de la fagocitosis de levaduras	C5b
5. Mediadores de la inflamación:	
a. Factor quimiotáctico	C3a, C5a, C5b67
b. Anafilotoxinas	C3a y C5a
c. Incremento de la permeabilidad vascular	Fragmento de C2?
d. Liberación de leucocitos de médula ósea	C3b
6. Lisis celular	C8 y C9
7. Moduladores de la respuesta inmune	?C4b, 7C3b, ?C3d

das y deficiencias adquiridas. Estas últimas persisten por largos periodos de tiempo y predisponen a enfermedades principalmente de tipo autoinmune. La tabla 3 muestra las enfermedades asociadas a cada una de las deficiencias de los componentes del sistema del complemento que se conocen, siendo desconocidas únicamente deficiencias para los factores B y D de la vía alterna, así como para C9. Los individuos deficientes de el componente terminal del complemento aparentemente son más susceptibles de ser atacados por agentes infecciosos, principalmente por bacterias Gram negativas. La existencia de individuos homocigotos deficientes de C3 con infecciones recurrentes, establece claramente el papel de C3 en el mantenimiento de las defensas normales del huésped. El componente C3 puede no sólo ser crítico en la reacción bactericida sino también en el aumento de la fagocitosis a través de la presencia del receptor C3b en neutrófilos y monocitos.

El aparente aumento de la frecuencia de enfermedades tales como el LEG y polimiositis en individuos con deficiencias del complemento, está en contradicción con el supuesto papel del complemento como mediador de inflamación en estas enfermedades reumáticas. Sin embargo, apoya el papel del complemento como participante en la eliminación de complejos inmunes, los cuales en estas enfermedades se encuentran en cantidades elevadas.

3.6.3 POLIMORFISMO DEL HLA

El elevado polimorfismo del complejo HLA se ha demostrado por el número de alelos de cada uno de los locus que los integran, presentándose 23 alelos detectables en el locus A, 48 alelos en

TABLA 3.

DEFICIENCIA DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.

Componente	Enfermedad Asociada
C1q C1r	Glomerulonefritis, Sepsis crónica Síndrome semejante a lupus, Glomérulo nefritis, lupus discoide crónico.
C1s C2	Lupus eritematoso generalizado. Lupus eritematoso generalizado, dermatomiositis, vasculitis, enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones bacterianas.
C4	Lupus eritematosos generalizado.
C3	Infecciones bacterianas recurrentes.
C5	Lupus eritematosos generalizados, infecciones recurrentes.
C6	Infecciones bacterianas recurrentes principalmente por <u>Neisseria</u> .
C7	Fenómeno de Raynaud's con esclerodactilia, lupus eritematoso generalizado, infecciones bacterianas recurrentes.
C8	Infecciones bacterianas recurrentes, lupus eritematoso generalizado, xeroderma pigmentoso.
C9	Ninguna.
C1 INH	Angioedema hereditario.
I	Infecciones bacterianas recurrentes.
P	Infecciones bacterianas recurrentes <u>Neisseria</u> .

locus B, 8 en el locus C, 16 en el DR, 19 en el locus D, 6 en el DP y 3 en el DQ. Los alelos del HLA-A, B, C, DR, DP y DQ son detectados por pruebas de microlinfocitotoxicidad mediada por complemento. Los alelos del locus D son determinados por medio de una reacción en cultivo mixto de linfocitos. Los alelos de cada uno de los locus que componen el sistema HLA se muestran en la tabla 4.

3.6.4 POLIMORFISMO DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Los loci del complemento ligados al HLA están constituidos por un locus para C2, uno para el factor B y dos loci para C4 (C4A y C4B), todos mapeados entre los genes clase II y los clase I.

La fracción de recombinación entre los loci del complemento y el locus HLA-B, ha sido estimada en aproximadamente 0.8 unidades de recombinación o centimorgan (cM). Los loci del complemento son los más polimórficos después del locus HLA-B, como se muestra en la tabla 5.

TABLA 4.

ALELOS DE LOS LOCUS DEL SISTEMA HLA.

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
A1	B5	B49 (21)	Cw1	Dw1	DR1	DQw1
A2	B7	Bw50 (21)	Cw2	Dw2	DR2	DPw1
A3	B8	B51 (5)	Cw3	Dw3	DR3	DPw2
A9	B12	Bw52 (5)	Cw4	Dw4	DR4	DPw3
A10	B13	Bw53	Cw5	Dw5	DR5	DPw4
A11	B14	Bw54 (22)	Cw6	Dw6	DR6	DPw5
A19	B15	Bw55 (22)	Cw7	Dw7	DR7	DPw6
A23(9)	B16	Bw56 (22)	Cw8	Dw8	DR8	
A24 (9)	B17	Bw57 (17)		Dw9	DR9	
A25 (10)	B18	Bw58 (17)		Dw10	DRw10	
A26 (10)	B21	Bw59		Dw11	DRw11	
A28	B22	Bw60 (40)		Dw12	DRw12	
A29	B27	Bw61 (40)		Dw13	DRw13	
A30	B35	Bw62 (15)		Dw14	DRw14	
A31	B37	Bw63 (15)		Dw15		
A32	B38 (16)			Dw16	DR52	
Aw33	B39 (16)			Dw17	DR53	
Aw34	B40	Bw64		Dw18		
Aw36	B41	Bw65		Dw19		
Aw43	Bw42	Bw67				
Aw66	B44 (12)					
Aw68	B45 (12)					
Aw69	Bw46	Bw70				
	Bw47	Bw71				
	Bw48	Bw72				
		Bw4				
		Bw6				

TABLA 5.

POLIMORFISMO DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS MOLECULAS DEL
COMPLEMENTO

FB	C2	C4A	C4B
S	C	Q0*	Q0*
S1	B	1	1
F	Q0*	2	2
F1	A1	3	3
Otros**	Otros**	4	Otros**
		5	
		6	
		7	
		Otros**	

* Alelos nulos.

** Alotipos con frecuencias menores de 0.01.

4. OBJETIVOS.

1. Determinar si familiares de pacientes con síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos "primario" y de pacientes con LEG presentan anticuerpos anti-cardiolipina.

2. Estudiar si existe asociación entre el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos y alelos de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

3. Identificar a individuos con haplotipos del CPH que predisponen al síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos "primario", para su tratamiento temprano en el momento de la primera manifestación clínica.

5. MATERIAL Y METODOS.

El presente estudio se realizó en 93 individuos normales, ocho con síndrome de anti-fosfolípidos "primario", 28 individuos que componen los familiares de los pacientes con este síndrome, 65 pacientes con LEG y 378 individuos que componen las familias de los pacientes con LEG. A todos los individuos se les determino anticuerpos anti-cardiolipina. Las moléculas clase I, II y - III del complejo principal de histocompatibilidad fueron tipificadas en los pacientes con el síndrome de anti-fosfolípidos primario y sus familiares. A los pacientes con LEG y sus familiares se les tipificó sólo las moléculas clase III. Tabla 6. Las frecuencias de los marcadores del CPH de los pacientes se compararon con la frecuencia de la población normal mexicana.

5.1 CRITERIOS DE INCLUSION DE PACIENTES CON "SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS PRIMARIO".

Se consideraron pacientes con síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario, quienes cumplieran los siguientes criterios clínicos y de laboratorio: una manifestación mayor y dos menores, o dos manifestaciones mayores, anticuerpos anti-cardiolipina positivos (en alguna de sus determinaciones), tener un año o más de evolución y no reunir los criterios para enfermedades del tejido conjuntivo.

Manifestaciones mayores:

- Pérdida fetal recurrente.
- Trombosis arterial.
- Trombosis venosa.

TABLA 6.

DETERMINACIONES REALIZADAS A LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Individuos	Anticuerpos aCL	Moléculas del CPH		
		Clase I	Clase II	Clase III
Sanos.	Si	No	No	No
Pacientes con síndrome de anti-fosfolípidos primario.	Si	Si	Si	Si
Familiares de pacientes con síndrome de anti-fosfolípidos primario.	Si	Si	Si	Si
Pacientes con LEG.	Si	No	No	Si
Familiares de pacientes con LEG.	Si	No	No	Si

- Trombocitopenia.
- Anemia hemolítica.
- Livedo reticularis.

Manifestaciones menores:

- Corea.
- Migraña.

5.2 PACIENTES CON LEG.

Los pacientes con LEG fueron diagnosticados por el personal médico del Departamento de Inmunología y Reumatología del INNSZ, de acuerdo a los criterios revisados en 1982 para la clasificación de pacientes con LEG (116).

5.3 DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA.

El presente estudio involucra cinco grupos de personas: 1) individuos sanos, 2) pacientes con síndrome de anti-fosfolípidos primario, 3) familiares de pacientes con síndrome de anti-fosfolípido primario, 4) pacientes con LEG y 5) familiares de pacientes con LEG.

1) Individuos sanos. Se estudiaron 93 individuos sanos de ambos sexos y de edades entre 18-60 años, los cuales sirvieron para establecer los valores normales de anticuerpos anti-cardiolipina. De los 93 individuos, 91 fueron estudiados para anticuerpos anti-cardiolipina de la clase IgG y el total para clase IgM. Los valores normales se consideraron en función de la media más dos desviaciones estándar ($\bar{X} + 2DE$).

2) Pacientes con síndrome de anti-fosfolípidos primario. Se

estudiaron todos los casos del síndrome detectado en el INNSZ -- hasta Junio de 1988.

3) Familiares de los pacientes con el síndrome de anti-fosfolípidos primario. De los pacientes con el síndrome, se estudiaron 6 familias que correspondían al total de las familias de los pacientes, ya que existen familias con más de un individuo con el síndrome.

4) Pacientes con LEG. Se estudiaron 65 pacientes con LEG para detectar a quienes tienen títulos anormales de anticuerpos anti-cardiolipina y estudiarlos en sus moléculas clase III del CPH.

5) Familiares de los pacientes con LEG. De los pacientes con LEG se estudiaron 59 grupos que corresponden al total de las familias de los pacientes, ya que existen familias con más de un individuo con la entidad patológica.

5.3.1 MANEJO DE LAS MUESTRAS

Los sueros usados para la determinación de anticuerpos anti-cardiolipina fueron alicuotados en criotubos (Nunc) de 1 ml y se almacenaron a -70 °C hasta su análisis. Dadas las condiciones de almacenaje y considerando que las muestras no se descongelaron -- hasta que fueron ensayadas, no fue necesario el uso de conservadores ni de inhibidores de proteasas. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Equipo:

1. Mini-Lavador de ELISA semi-automático (Organon Teknika).
2. Lector de Micro-ELISA (Tritertek Multiskan).

3. Equipo general de laboratorio.

Material:

1. Material general de laboratorio.

Reactivos:

1. Antiglobulinas humanas. Preparadas en cabra marcadas con fosfatasa alcalina, específicas anti-cadena Mu y anti-cadena -- Gamma (Sigma).
2. Suero bovino fetal (SBF) (Sigma).
3. Cardiolipina. De corazón de buey, sal sódica disuelta en etanol (Sigma).
4. Alcohol etílico absoluto (J. T. Baker).
5. Nitrógeno (gas).
6. P-nitrofenilfosfato disódico, que es el sustrato de la enzima fosfatasa alcalina (Sigma).
7. Placas de 96 pozos para Micro-ELISA (Nunc 97F 4-39454).
8. Solución salina de fosfatos (PBS). NaCl 0.15 M, Na₂HPO₄ 0.01 M y KH₂PO₄ 0.01 M pH 7.4.
9. Solución salina de glicina. Glicina 0.1 M, MgCl₂ 0.001 M, ZnCl₂ 0.001 M pH 10.9
10. Solución de PBS-SBF. Suero bovino fetal al 10% en solución salina de fosfatos.
11. Solución de NaOH 3 N.

Material Biológico:

1. Tres ml de suero tomados de 5 ml de sangre sin anticoagulante.

Técnica:

Fundamento.

La técnica de ELISA es un método muy sensible para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos.

Este método está basado en la medición espectrofotométrica de un cromóforo que es liberado por la acción de una enzima al actuar sobre su sustrato (incoloro), en función de la cantidad de antígeno o anticuerpo presente.

El ensayo, dados sus tiempos de incubación, es un proceso largo, por lo que se ha dividido en tres pasos, los cuales son: A. Sensibilización de la placa, B. Ensayo de los sueros problema, y C. Revelado de la placa. La sensibilización de la placa y las diluciones de los sueros se hacen en un día. Al siguiente, se realiza el ensayo de los sueros y el revelado de la placa (109, 110).

En el presente estudio se determina el anticuerpo anti-cardiolipina mediante el ensayo de ELISA "indirecto", en el cual el antígeno se encuentra pegado en la fase sólida. El anticuerpo, si se encuentra presente en el suero ensayado, se pega a su antígeno y será detectado por un conjugado de anticuerpo anti-inmunoglobulina humana, marcado con la enzima fosfatasa alcalina (enzima de intestino de ternera), que al actuar sobre su sustrato (p-nitrofenilfosfato) libera por hidrólisis un cromóforo (p-nitrofenol) en función de la cantidad de enzima presente y por tanto de anticuerpos anti-cardiolipina (figura 4). La cantidad de color producida se mide espectrofotométricamente a una

a. Antígeno pegado a la fase sólida.



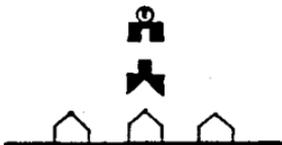
b. Lavado.

c. Incubación con la muestra que contiene al anticuerpo.



d. Lavado.

e. Incubación con el conjugado de enzima anti-globulina.



f. Lavado.

g. Incubación con el sustrato de la enzima (a) y medición del producto (b)



ENSAYO DE ELISA[®]INDIRECTO[®] PARA LA DETECCIÓN DE UN ANTICUERPO ESPECIFICO. LA D.O. SE MIDE A 405 nm.

Figura 4

longitud de onda de 405 nm (107, 108).

A. Sensibilización de la placa. A la placa de 96 pozos para micro-ELISA se le adicionan 50 ul de una solución alcohólica de cardiolipina con una concentración de 43 ug/ml, aproximadamente 2.15 ug de cardiolipina por pozo. El alcohol se evapora de la placa con nitrógeno gaseoso por 30 minutos. Para bloquear los sitios inespecíficos de la placa, se adicionan 350 ul de PBS-SBF al 10% por pozo. La placa se incuba a temperatura ambiente por dos horas. La placa se lava tres veces con 350 ul de PBS por pozo y cada lavado es de tres minutos. Se escurre la placa perfectamente golpeandola sobre una superficie suave, absorbente. La placa se cubre con cinta adhesiva y se guarda a 4 °C para ser usada al día siguiente.

B. A la placa sensibilizada se le adicionan 200 ul de una dilución 1:50 de suero problema en PBS-SBF 10% por duplicado. Se incuba una hora a temperatura ambiente. A su vez se pone en tres puntos de la placa una mezcla de sueros normales ("poza"), que tiene como finalidad el disminuir las variaciones del ensayo y proporcionar el valor de referencia del índice. La "poza" debe ir también a una dilución de 1:50 en PBS-SBF 10%. Cada placa lleva una serie de 6 pozos "BLANCO", los cuales dan la D.O. de la cardiolipina y todo el proceso, pero sin el suero problema. Las placas se lavan nuevamente con PBS, tres veces, tres minutos cada lavado, y se secan como se mencionó anteriormente.

C. Revelado de las placas. Se adicionan 200 ul de conjugado diluido 1:1000 en PBS-SBF al 10% por pozo (anticuerpo anti-IgG o

IgM humana conjugando con fosfatasa alcalina). Las placas se incuban nuevamente por una hora a temperatura ambiente. Se lavan - nuevamente con 350 ul de PBS por pozo, tres minutos cada lavado y se seca la placa. Se adiciona a cada pozo 200 ul de sustrato - de la enzima (p-nitrofenilfosfato disódico) disuelto en solución de glicina de PH 10.9 a una concentración de 1 mg/ml. Las placas se incuban a 37 °C una hora en la obscuridad. Transcurrida la hora, la acción de la enzima fosfatasa alcalina se detiene con 100 ul de NaOH 3 N por pozo. Las placas se leen inmediatamente en el lector de micro-ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Para calcular los valores de los índices de IgG e IgM se aplicó la siguiente formula (107, 108):

$$\frac{\text{D.O. de la muestra problema}}{\text{D.O. de la poza de sueros normales}} = \text{Índice de IgG o IgM.}$$

5.4 TIPIFICACION DE LOS ANTIGENOS HLA-A Y HLA-B

Las diferentes variantes de estos locus se determinan por la técnica de microlinfocitotoxicidad utilizando un panel de antisueros que detectan más de 100 especificidades. Estos marcadores son tipificados en células mononucleares totales.

5.4.1 MANEJO DE LAS MUESTRAS

Las células mononucleares obtenidas por gradientes de Ficoll-Hypaque se cuentan y ajustan a 10 millones/ml en RPMI (volumen - X). En un recipiente con hielo se colocan la solución congelante (3 partes de RPMI, 1 parte de dimetil sulfoxido y 1 parte de suero bovino fetal) y el tubo que contiene las células ajusta-

das. Al tubo que contiene las células (volumen X) se le añade el mismo volumen de solución congelante (proporción 1:1). Se mezcla con agitación suave y se alicuota en criotubos (Nunc) de 1 ml colocandolos rápidamente a -70°C . Las muestras se descongelan hasta que son analizadas.

Equipo:

1. Centrifuga CO-500 Damon/JEC División.
2. Microscopio de luz (Zeiss).
3. Cámara de Neubauer.
4. Microscopio de contraste de fases (Zeiss).

Material:

1. Placa de histocompatibilidad Nunc.
2. Jeringa Hamilton de disparo constante (1 ul).
3. Jeringa múltiple Hamilton de disparo constante (5 ul).
4. Jeringa múltiple Hamilton de disparo constante (1 ul).
5. Material general de laboratorio.

Reactivos:

1. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4.
2. Solución de Ficoll-Hypaque con densidad de 1.007.
3. Formalina al 40%.
4. Eosina al 5%.

Material Biológico:

1. 20 ml. de sangre obtenida con heparina como anticoagulante.
2. Antisueros a granel.

3. Complemento de conejo (Peel-Freez).

Técnica:

Fundamento.

El método está basado en el reconocimiento de los antígenos - presentes en las células mononucleares y su posterior lisis mediada por complemento. Los antígenos son tipificados mediante un panel de antisueros que detectan más de 100 especificidades.

A. Obtención de células. Se obtuvieron las células mononucleares por centrifugación de 20 ml. de sangre heparinizada en un gradiente de Ficoll-Hypaque. Dichas células son extraídas de la interfase y resuspendidas en PBS. Nuevamente se centrifugan las células durante 15 minutos a 1500 rpm (primer lavado). El paquete es resuspendido en PBS y se centrifuga por 10 minutos a 1200 rpm -- (segundo lavado). Finalmente se realiza un tercer lavado en las mismas condiciones que el anterior. El paquete celular es resuspendido y llevado a una concentración final de 5×10^6 células/ml.

B. Montaje de la técnica de microlinfocitotoxicidad. Las placas de tipificación (72 pozos) se montan utilizando 72 antisueros - (1 ul por pozo) y aceite mineral (una gota) para evitar la evaporación de estos. En cada pozo de la placa de tipificación, se coloca 1 ul de la suspensión de células previamente ajustadas. La placa es incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se colocan 5 ul de complemento de conejo a cada pozo y se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se agregan 2 ul de ecsi na al 5% a cada pozo y se incuba 3 minutos. Finalmente, se agregan 5 ul de formalina al 40% para detener la reacción y se lee

la placa en un microscopio de fase invertida.

5.5 TIPIFICACION DE COMLOTIPOS

5.5.1 MANEJO DE MUESTRAS

Los plasmas usados para la tipificación de complotipos se alicuataron en criotubos (Nunc) de 1 ml y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Dadas las condiciones de almacenaje y considerando que las muestras no se descongelaron hasta que fueron - ensayadas no fue necesario el uso de conservadores ni de inhibidores de proteasas.

5.5.2 FACTOR B DE LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO

El polimorfismo de los factores B y C4 se determina mediante las técnicas de inmunofijación y electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa. Terminada la electroforesis, las proteínas - se fijan mediante anticuerpos específicos.

Equipo:

1. Cámara de Deluxe para electroforesis Gelman Science.
2. Fuente de poder Deluxe Gelman Science.
3. Bomba de agua circulante Thomas Scientific.
4. Equipo general de laboratorio.

Material:

1. Rectángulo de película de plástico de 10 x 20 cm (gel -- Bond Film Marine Colloids. Maine USA).
2. Placa de vidrio de 10 x 20 cm.
3. Marcos de plástico en forma de "U" de 1 mm de espesor.

4. Papel filtro Whatman No. 1.
5. Aplicador de muestras.
6. Sujetadores.

Reactivos:

1. Amortiguador de barbital y lactato de calcio pH 8.6 0.05M.
2. Agarosa Sea-Kem Marine Colloids Maine USA. (Se prepara al 1% en amortiguador de barbital.
3. Solución salina al 0.85%.
4. Glicerol.
5. Solución de azul de Coomassie al 2.5% (en una solución de 45% de metanol, 10% de ácido acético en agua).
6. Metanol al 50% en agua destilada, más la quinta parte del volumen total de ácido acético (solución decolorante).

Material Biológico:

1. Plasma EDTA obtenido de 5 ml de sangre.
2. Una alícuota de hemoglobina humana.
3. Anticuerpo anti-factor B. Atlantic. Antibodies. Scarborough Mo USA.

Técnica:

Fundamento:

El método se basa en la migración electroforética de las proteínas del complemento y la formación de complejos antígeno-anticuerpo por anticuerpos específicos, que al ser teñidos dan patrones de bandas característicos.

A. Preparación del gel. Cubrir la placa de vidrio mediante una brocha con una capa fina de glicerol e inmediatamente colocar la película de plástico y presionar para sacar las burbujas de aire. Posteriormente colocar el marco de plástico en forma de "U", el cual se fija a la placa mediante los sujetadores. Una vez lista la cámara, vaciar la solución de agarosa caliente y dejar solidificar. Ya que solidificó el gel, se quitan los sujetadores y el marco de plástico, y se seca con papel filtro la zona de aplicación de las muestras.

B. Aplicación de las muestras. Con el papel filtro Whatman # 1 se sacan aproximadamente 3 cm del final del gel (a todo lo largo de este) donde se aplicarán las muestras (cátodo), repetir el proceso dos veces. Sobre el área seca se coloca un aplicador plástico que tiene perforaciones rectangulares para poner las muestras (MASK). En la primera perforación se colocan aproximadamente 10 ul de Hb A, que sirve como indicador de corrimiento, y en las demás perforaciones se coloca el mismo volumen, pero de cada muestra. Se espera hasta que las muestras se hayan absorbido en el gel (aproximadamente 15 min). Se quita el exceso de muestra del gel con papel Whatman # 1 y se retira el aplicador de plástico MASK.

C. Corrimiento de la muestra. Las placas se colocan sobre bases enfriadas por agua circulante (entre 6 y 10 °C) para evitar el sobrecalentamiento del gel de agarosa y que se derrita o que las proteínas se desnaturalicen. El contacto entre el gel y la solución amortiguadora (electrodo, solución 1) es una mecha de 5 hojas de papel filtro Whatman # 1 (del mismo ancho que la

placa del gel) perfectamente humedecida en la solución 1. Una de las puntas de la mecha se coloca exactamente atrás de las muestras y la otra a 1 cm del final del gel. La superficie del gel se cubre con un plástico o vidrio para evitar desecamiento. La electroforesis se lleva a cabo a 350 volts (75 mA) hasta que la Hb haya migrado hasta casi alcanzar la segunda mecha (3 horas aproximadamente).

D. Inmunoprecipitación. En las condiciones electroforéticas anteriores, las proteínas del factor B emigran en una zona de 3 a 6.5 cm del origen. En esta zona se aplica el anticuerpo específico anti-factor B humano. El gel es incubado durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda horizontal. Posteriormente, el gel se enjuaga con agua destilada y se cubre con papel Whatman # 1, el cual ha sido humedecido con agua destilada. Esto se cubre con aproximadamente 12 hojas de papel secante tipo toalla. Se coloca encima una placa de plástico y un peso de 4 Kg. Se remueve el peso después de 10 minutos y se quitan las toallas. El gel se enjuaga durante toda la noche en aproximadamente un litro de solución salina, para remover restos de proteínas inespecíficas. Al día siguiente, se seca con aire ya sea a temperatura ambiente o aplicando calor. La placa se tiñe con solución de azul de Coomassie por 10 minutos (solución 5). Se enjuaga la placa con solución decolorante hasta obtener el mejor contraste (solución 6). Se deja evaporar el exceso de metanol a temperatura ambiente y se lee la placa. Existen patrones electroforéticos estándar con los cuales se comparan los patrones obtenidos.

5.5.3 CUARTO COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El cuarto componente del sistema del complemento (C4), es controlado por dos loci localizados muy cerca uno del otro, entre los loci HLA-B y HLA-D/DR del cromosoma 6 humano. El elevado polimorfismo de este componente es revelado por electroforesis de alto voltaje seguida de inmunoprecipitación y tinción de las muestras de plasma con EDTA, previamente tratadas con neuraminidasa para eliminar el ácido siálico.

Equipo:

El mismo que para factor B.

Material:

1. Fibra de vidrio de Corning Glass Woks, N. Y.
2. Placa de vidrio de 13 X 20 cm.
3. Papel celofán secado a temperatura ambiente durante 6 meses.
4. El mismo material que para factor B.

Reactivos:

1. Amortiguador de fosfatos, 5 mM de Na₂EDTA para diálisis pH 6.8.
2. Amortiguador de corrimiento. Tris-glicina /Barbital pH 8.8.
3. Agarosa de electroendosmosis mediana INC. PHARMACEUTICAL CO. USA.
4. Solución de agarosa al 0.75% en amortiguador de corrimiento y 5 ml de EDTA al 0.2 M y agua destilada hasta 100 ml.

5. Solución salina al 0,85%

Material Biológico:

1. Plasma EDTA obtenido de 5 ml de sangre.
2. Hemoglobina A como marcador.
3. Anticuerpo anti-C4 humano. Atlantic. Antibodies.
Scarborough, Mo. USA.
4. Neuraminidasa tipo VI. Obtenida de Clostridium perfringens.
Sigma Chemical Co. St. Louis USA.

Técnica:

Fundamento.

El método se basa en la migración electroforética de las proteínas del complemento y la formación de complejos antígeno-anticuerpo, por anticuerpos específicos, que al ser teñidos dan patrones de bandas característicos.

A. Desialación. 10 ul de la muestra se mezclan con 2 ul de neuraminidasa y se colocan en un sistema de diálisis continuo durante 18 horas a 4 °C.

B. Preparación del gel de corrimiento. Se cubre una placa de vidrio con una solución de agarosa al 0.5% en agua destilada y se deja secar. Una vez seco se forma un molde colocando sobre la placa anterior una segunda placa de plástico siliconizada y entre ellas el marco de 1 mm de espesor. Se mantienen juntas las placas mediante los sujetadores metálicos. Se vierte la solución de agarosa de corrimiento para C4 (solución 3), aún caliente, dentro del molde y se deja solidificar. Se sella perfectamente el molde con una cubierta de plástico y se almacena

en refrigeración hasta su uso.

C. Colocación de muestras. Se reduce el exceso de agua del gel de corrimiento, colocando dos veces sobre él una tira de 5 cm de ancho de papel filtro. Sobre la parte anterior se coloca el aplicador de plástico para muestras (MASK), de tal forma que las muestras queden a unos 2 cm del extremo final del gel. Se colocan de 7 a 10 μ l de las muestras dializadas en cada ranura del aplicador. Se coloca una muestra de Hb al principio del gel, como marcador visual. Una vez que las muestras se han absorbido en el gel, se retira el aplicador.

D. Corrimiento electroforético. La placa con el gel se coloca en el equipo de electroforesis, con las muestras en el lado del cátodo. Se mojan en conjunto 5 hojas de papel Whatman (del tamaño de la placa del gel) en el amortiguador de corrimiento (solución 2) y se colocan en ambos extremos (ánodo y cátodo) de la placa del gel (2 cm antes del final). Se cubre la placa para evitar desecamiento del gel y se ajusta la fuente de poder a una corriente constante de 65 mA (300-500 V), se deja el corrimiento hasta que el marcador de Hb ha alcanzado el extremo opuesto (4-5 horas).

E. Inmunoprecipitación y tinción. Se distribuye 1 ml de anticuerpo anti-C4 humano en un área de 5 cm en el centro del gel. Se incuba durante una hora en una cámara húmeda. Se enjuaga cuidadosamente el gel bajo chorro de agua corriente. Se cubre el gel con una hoja de papel Whatman, humedecido con agua destilada seguido de 10 hojas de papel absorbente y una placa de vidrio

Se coloca arriba un peso de 4 kg manteniéndose así durante 10 minutos. Se enjuaga el gel en solución salina durante toda la noche. Se lava el gel con agua corriente durante 29 minutos. Se seca y se tiñe con solución de azul de Coomassie al 2.5%. Se destiñe hasta alcanzar un contraste óptimo (solución 6 de factor B). Las bandas obtenidas se comparan con patrones estándar.

5.5.4 SEGUNDO COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El polimorfismo del segundo componente del complemento puede ser detectado después del electroenfoque de muestras de plasmas o suero en un gel de acrilamida seguido de la aplicación de un recubrimiento hemolítico funcional. La lisis por el complemento ocurre en el sitio que contiene eritrocitos de carnero sensibilizados con todos los componentes del complemento, excepto C2, esa será la posición de C2 en el gel de electroenfoque.

Equipo:

1. Equipo de electroenfoque. Multiphore LKB.
2. Equipo general de laboratorio.

Material:

1. Placas de vidrio de 10 x 20 cm y de 2 mm de espesor.
2. Marco de plástico de 10 x 20 cm y de 1 mm de espesor.
3. Marco de plástico de 20.5 x 11.0 cm y 1 mm de espesor.
4. Sujetadores.
5. Material general de laboratorio.

Reactivos:

1. Acrilamida. Eastmal Kodak Company Printed.
2. Anfolinas pH 5-8 y 3.5-10. LKD Sweden, USA.
3. Riboflavina (solución al 1% en agua destilada). Bio-Rad. Laboratories, Richarmon, Calif. USA.

Material Biológico:

1. Plasma EDTA proveniente de 5 ml de sangre.
2. Suero humano deficiente de C2.
3. Eritrocitos de carnero sensibilizados.

Técnicas:

Fundamento.

El ensayo se basa en la migración electroforética de la proteína C2 del complemento y la medición posterior de su acción lítica con eritrocitos de carnero sensibilizados, que da patrones de bandas características.

A. Preparación del gel. Se coloca un vidrio de 10 x 20 cm, un marco de plástico de 1 mm de espesor y 0.5 cm de ancho (el marco cubre tres lados del vidrio). Encima de este último se coloca -- una placa de plástico siliconizada de las mismas dimensiones del vidrio. Se mantienen las placas juntas con los sujetadores de tal forma que se obtiene una cámara de 1 mm de espesor con un extremo abierto.

En un matraz se colocan 40 ml de solución de acrilamida al 6%, 10.8 ml de riboflavina al 1%, 2 ml de anfolina pH 5-8, 0.4 ml de anfolina pH 3.5-10, se mezcla y se desgasifican.

El gel es vaciado en la cámara preparada como se menciona an

teriormente.

B. Aplicación de las muestras. Para la aplicación de las muestras se usan rectángulos de papel filtro de 0.5 x 2.0 cm, situados a 3 mm uno del otro y colocados a 2.5 cm. de distancia del electrodo anódico. La distancia entre cada tira de papel debe -- ser tal que permita colocar aproximadamente 20 tiras por gel. Se aplican 20 ul de muestra sobre cada tira de papel.

C. Corrimiento de las muestras. El aparato para electroenfoque se coloca en cuarto frío a 4 °C. Se coloca el electrodo positivo exactamente atrás de las muestras y el electrodo negativo aproximadamente a 9 cm adelante de estas. Se ajusta la fuente de poder a 1.5 Watts/gel, un voltaje máximo de 1000 y una corriente inicial de 6 mA/gel (media hora). Se enfoca el gel durante 18 horas, o hasta que la corriente haya caído a 2 mA/gel.

D. Preparación del gel para revelar C2. En un matraz agregar 14.5 ml de agarosa al 0.6%, 10 ul de suero humano deficiente en C2. Se calienta la solución y cuando está a 70 °C, se agregan - 14.5 ml de eritrocitos de carnero sensibilizados.

E. Ensayo hemolítico. Una vez que ha terminado de correr la muestra, colocar sobre la placa de electroenfoque un marco de - plástico (20.6 x 11.0 cm), y cortar el gel sobrante. A la placa que contiene ahora las muestras y el marco ponerle otra placa - y colocar los sujetadores, vaciar el gel (para revelar C2) e in - cubar a 37 °C por espacio de 2 horas. Una vez finalizada la in - cubación se hace la lectura de la placa.

F. Fijación de la placa. Si se quiere conservar la placa pa -

ra hacer lecturas posteriores, se puede fijar esta con una solución de glutaraldehído al 0.1% en PBS por 10 minutos; para ello quitar el gel de poliacrilamida quedándose sólo con el gel de agarosa e introducir la placa en la solución de glutaraldehído y dejar secar. Los patrones de bandas obtenidos para este componente se comparan con patrones estándar.

6. RESULTADOS.

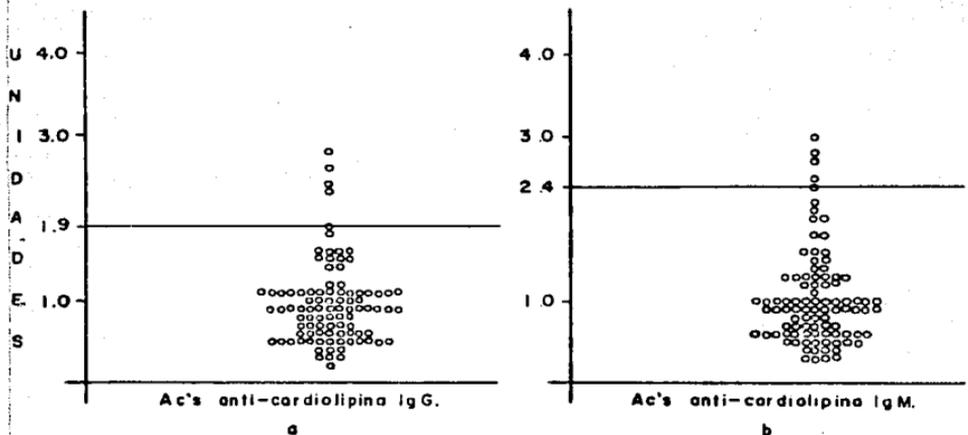
De los 93 individuos sanos estudiados para determinar los índices normales de anticuerpos anti-cardiolipina (aCL), se obtuvieron los resultados siguientes: para IgG aCL son de 0 a 1.9 - unidades y para IgM de 0 a 2.4. Para sacar estos valores se tomó en cuenta el promedio más dos desviaciones estándar (D.E.) que comprenden el 95% de la población estudiada. Los resultados de los índices para IgG e IgM aCL en la población normal se muestran en las figuras 5a y 5b y se resumen en la tabla 7.

Los anticuerpos aCL en pacientes con LEG se han reportado con una prevalencia del 23.0%. No obstante, en un estudio realizado en 500 pacientes con LEG en el INNSZ, la prevalencia observada fue de 45.0%. (Datos no mostrados).

Dentro de los pacientes con LEG que presentaron anticuerpos aCL con índices mayores a 5 D.E., se estudiaron a sus familias, encontrándose que existen individuos con índices de anticuerpos aCL anormales y en algunos casos mayores a 5 D.E. (figura 6). En esta se observa que el 8.02% (39/486) de los individuos estudiados para IgG aCL presentan índices anormales, 2.7% (13/486) con índices mayores a 5 D.E. Para IgM aCL, 6.7% (24/360) de los familiares tienen índices anormales, 1.4% (5/360) mayores a 5 D.E.

En base a la positividad al anticuerpo aCL presentada tanto en pacientes con LEG como en sus familiares, se clasificaron en tres grupos: 1) familiares positivos-pacientes positivos; 2) familiares negativos-pacientes positivos; y 3) familiares positivos-pacientes negativos.

N O R M A L E S



INDICES DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA DE LAS CLASES IgG E IgM EN INDIVIDUOS NORMALES.

Figura 5

TABLA 7.

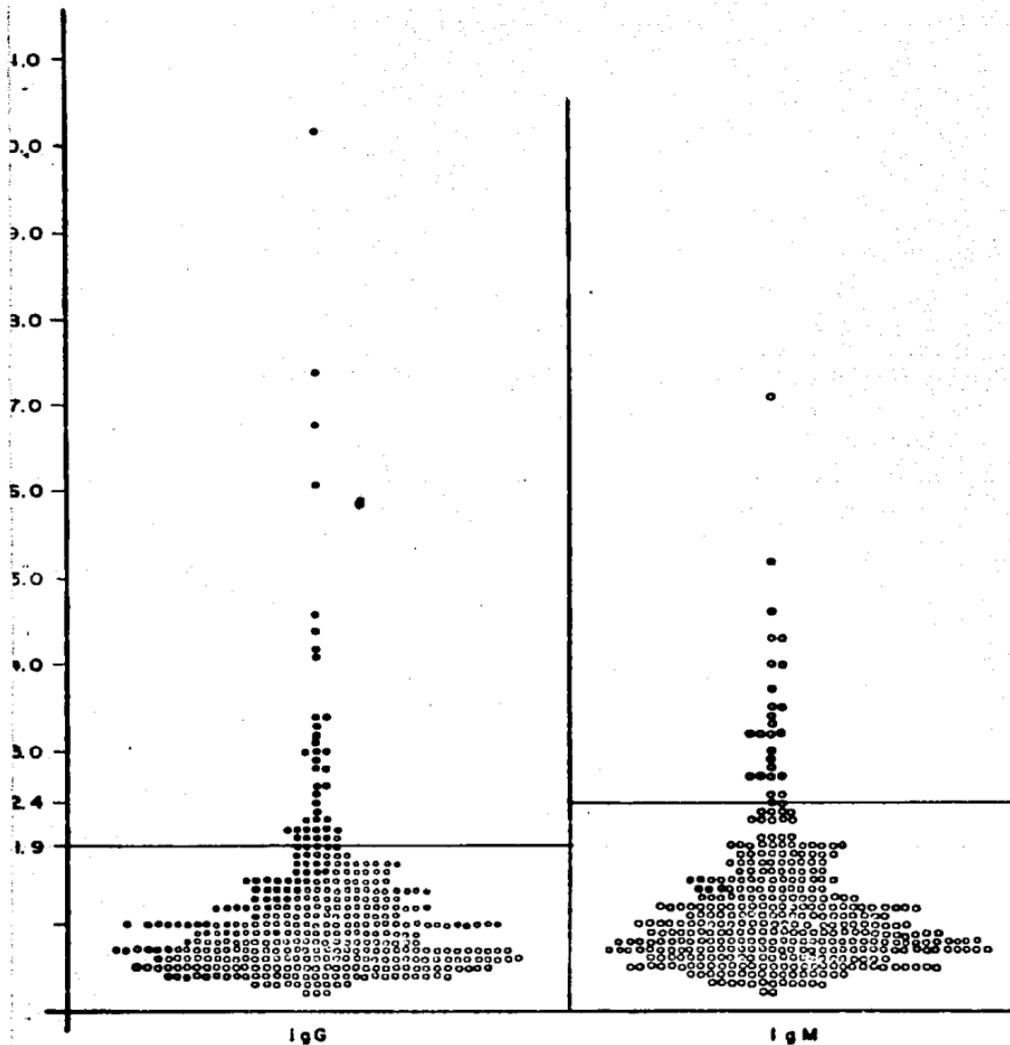
VALORES NORMALES DE LOS INDICES DE IgG e IgM

No. de individuos	Anticuerpo	\bar{X}	D.E.	$\bar{X}+2DE$	INDICE
91	IgG	0.91	0.48	1.88	1.9
93	IgM	1.08	0.67	2.4	2.4

Valores normales de los indices para:

IgG \leq 1.9

IgM \leq 2.4



DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE LOS INDICES DE IgG E IgM ANTI-CARDIOLIPINA EN FAMILIARES DE PACIENTES CON LEG.

Figura 6

El estudio de los complotipos de pacientes con LEG y sus familiares con respecto a positividad de anticuerpos aCL mostró, que existe cierta asociación entre la presencia de alelos nulos en C4A y C4B (tabla 8). 19 de 49 pacientes (39.0%) con anticuerpos aCL positivos tienen alelos nulos en C4A y 10 de 49 (20.5%) en C4B. La frecuencia de alelos nulos en C4A y/o C4B en pacientes con LEG fue de 0.67. En los familiares de los pacientes con LEG se observó que el alelo nulo en C4A estuvo presente en 13 de 63 individuos (21.0%) con anticuerpos aCL positivos, y C4B lo presentaron 9 de 63 (14.3%). La frecuencia de alelos nulos en C4A y/o C4B en familiares de pacientes con LEG con anticuerpos aCL positivos fue de 0.37.

La determinación de anticuerpos aCL en los pacientes con el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario, mostró que dos individuos tienen anticuerpos aCL clase IgG elevados y uno presenta IgM elevada. Previamente 5 pacientes tuvieron IgG aumentada y tres IgM aumentada. Valores mayores a 5 D.E. fueron reportados en cuatro de ocho pacientes para IgG y dos de los ocho para IgM. Los resultados se resumen en las tablas 9 y 10.

Al analizar a los pacientes con el síndrome de anti-fosfolípidos primario con relación a la positividad del anticuerpo aCL y el sexo, la distribución fue de siete mujeres y un hombre. De las siete mujeres tres, presentaron índices de anticuerpos aCL normales, tanto en la determinación actual como en las anteriores realizadas en el INNSZ. Una paciente presentó un índice de IgG alto pero menor de 5 D.E., e IgM elevado mayor a 5 D.E. Tres tuvieron

TABLA 8.

COMPLOTIPOS Y SU RELACION CON POSITIBIDAD A ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA

COMPLOTIPOS	PACIENTES		(pac-/fam+) N=24	FAMILIARES	
	(+) N=49	(-) N=16		(+) N=63	(-) N=315
SC01/SC31	8	1	1	8	37
SC42	3	-	1	-	4
SC30	2	-	1	-	6
FC31	2	-	1	5	14
FC30	1	-	2	-	3
SC30/SC31	4	-	2	6	18
FC01	2	-	-	-	-
FC31	1	-	-	2	6
SC21	1	-	1	-	-
FC30/SC31	2	-	1	1	11
FC01/SC33	1	-	-	1	-
% del total	55.1	6.2	41.6	36.5	31.4
SC31/SC31	5	6	6	7	44
FC31	3	-	1	6	30
SC42	2	1	-	3	28
Otros/Otros	12	8	7	24	114
% del total	44.9	93.8	58.3	63.5	68.6

TABLA 9.

POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN PACIENTES CON
"SINDROME DE ANTI-FOSFOLIPIDOS PRIMARIO"

Paciente	aCL fecha del estudio	aCL otra fecha	aCL (+) > 5 D.E.
1	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(+)	IgM
4	(+)	(+)	IgG
5	(-)	(+)	IgG e IgM
6	(+)	(+)	IgG
7	(+)	(+)	IgG
8	(-)	(-)	(-)

TABLA 10.

POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA CON RESPECTO A LA
CLASE DE INMUNOGLOBULINA

No. de pacientes	Positivo en la fecha del estudio	Positivo en otras fechas	Positivo > 5 D.E.
8	IgG 2	IgG 5	IgG 4
	IgG 1	IgM 3	IgM 2

valores de IgG e IgM mayores a 5 D.E. en todas sus determinaciones. El paciente masculino, en todas sus muestras colectadas, tuvo valores del índice de IgG superiores a 5 D.E., y valores de IgM altos pero menores de 5 D.E. (tabla 11). Los individuos con síndrome de anti-fosfolípidos primario, aun cuando en el estudio no presentaron positividad a anticuerpos aCL ni en determinaciones anteriores realizadas en el INNSZ, han tenido en algún momento anticuerpos aCL positivos (determinaciones hechas en el Centro Médico "La Raza", con valores normales proporcionados por el INNSZ), ya que es un criterio de inclusión para el síndrome la presencia de anticuerpos aCL positivos. De lo anterior, se asegura que todos los individuos con el síndrome son positivos a anticuerpos aCL en algún momento.

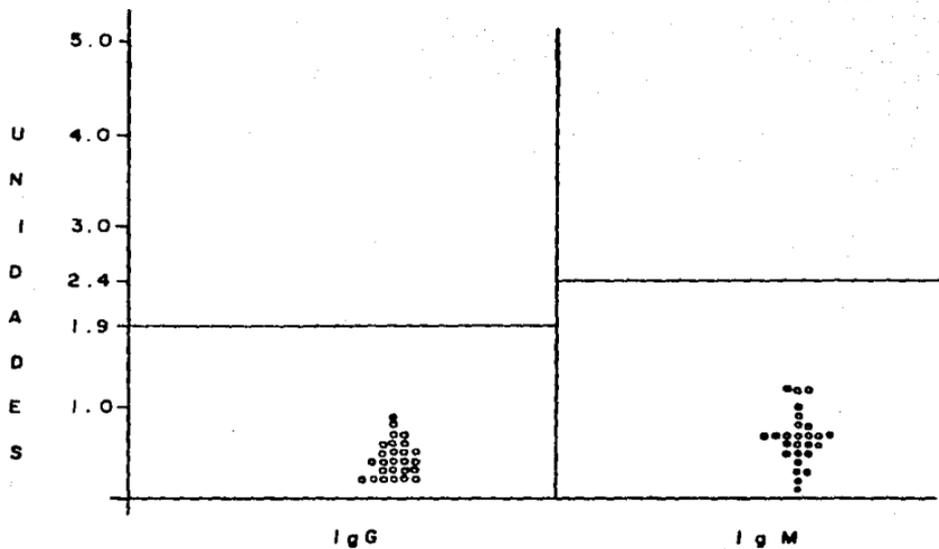
En los familiares de los pacientes con el síndrome, los estudios de anticuerpos aCL mostraron que ninguno de ellos presentó índices anormales (figura 7), a diferencia de los pacientes con LEG, cuyos índices de anticuerpos aCL son mayores a 5 D.E. en los que el estudio realizado en sus familiares se encontró que 8.02% de estos tienen índices por arriba de los valores normales y en algunos casos mayores a 5 D.E. tanto para IgG como para IgM. Dichos valores se muestran en la figura 6. En un estudio realizado en el INNSZ en familiares de pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), aproximadamente el 4.0% de estos tuvieron anticuerpos aCL con índices anormales. (Datos no mostrados. Tabla 12. 108).

El estudio de las moléculas del CPH en las familias de los -

TABLA 11.

POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA CON RESPECTO AL SEXO.

Sexo	No. de pacientes	INDICES	
		IgG	IgM
Femenino	7	3 normales 1 alto < 5 D.E. 3 altos > 5 D.E.	3 normales 1 alto > 5 D.E. 3 altos > 5 D.E.
Masculino	1	> 5 D. E.	alto < 5 D.E.



INDICES DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN FAMILIARES DE PACIENTES CON "SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS PRIMARIO"

Figura 7

TABLA 12.

POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN FAMILIARES DE
 PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Enfermedad	Ac's anti-cardiolipina (+) en familiares
L E G	8.02%
E M T C	4.0%
SINDROME DE ANTI-FOSFOLIPIDOS PRIMARIO.	0%

pacientes con el síndrome se identificaron los siguientes marcadores para moléculas clase I: A1, A2, A28, B5, B7, B15, B16, B17, B35 y B50. Moléculas clase II: DR1, DR2, DR4, DR5, DR6, DR7, -- DR8, DR10, DQ1, DQ2 y DQ3. Moléculas clase III: Factor B* S y F; C4A* 0, 2 y 3; C4B* 1 y 3.

Las frecuencias obtenidas de los marcadores del CPH en los pacientes con el síndrome, se comparan con las frecuencias de los , marcadores en la población normal mexicana (112, 113) (tablas 13, 14 y 15).

Como se puede ver, existe un aumento en la frecuencia de algu nos marcadores. Para moléculas clase I se encuentran aumentados en frecuencia A28, B16 y B17. Los marcadores DR6 y DR7 se encuen tran aumentados en frecuencia para las moléculas clase II. En - las moléculas clase III el alelo nulo en C4A esta aumentado en - frecuencia con respecto a la población general (112, 113).

El estudio de los complotípos proporcionó los resultados que se encuentran resumidos en la tabla 16, en la cual se puede ob- servar un incremento en la frecuencia del complotipo SC01 con - respecto a la frecuencia en la población mexicana normal.

Por otro lado, en un estudio realizado en el INNSZ en pacien- tes con LEG, se observó una alta frecuencia de alelos nulos en - C4A y C4B asociados a anticuerpos aCL positivos. De 65 pacientes estudiados 49 fueron positivos para el anticuerpo; de estos, 27 (55.1%) son portadores de alelos nulos en C4A y/o C4B y 22 (44.9%) son positivos al anticuerpo sin alelos nulos. Anticuerpos aCL - negativos fueron 16 (6.2%) de ellos y presentan alelos nulos en

TABLA 13.

MOLECULAS CLASE I.

Frecuencias Marcador	Frecuencias*	
	Frecuencias (Pacientes)	Frecuencias* (normales)
A1	0.5	0.188
A2	0.75	0.443
A28	0.125	0.59
B5	0.25	0.22
B7	0.125	0.13
B15	0.125	0.10
B16	0.25	0.02
B17	0.25	0.05
B35	0.25	0.36
B50	0.25	0.143

* Frecuencias tomadas de 200 individuos normales (112,113).

TABLA 14
MOLECULAS CLASE II.

Marcador	Frecuencia (pacientes)	Frecuencia* (normales)
DR1	0.375	0.22
DR2	0.125	0.10
DR4	0.375	0.56
DR5	0.125	0.17
DR6	0.125	0.056
DR7	0.5	0.15
DR8	0.125	0.078
DR10	0.375	0.011
DQ1	0.375	
DQ	0.25	
DQ3	0.25	

* Frecuencias tomadas de 200 individuos normales (112, 113).

TABLA 15.
MOLECULAS CLASE III.

Marcador	Frecuencias (pacientes)	Frecuencias* (normales)
fB*S	1.0	0.766
F	0.25	0.146
C2*C	1.0	0.980
C4A*0	0.75	0.151
2	0.125	0.05
3	1.0	0.600
C4B*1	1.0	0.665
3	0.125	0.01

* Frecuencias tomadas de 200 individuos normales (112, 113).

TABLA 16.

COMPLOTIPOS DE LOS PACIENTES CON SINDROME DE ANTI-FOSFOLIPIDOS
PRIMARIO.

Complotipo	Frecuencia (pacientes)	Frecuencia* (normales)
SC01	0.75	0.370
FC31	0.25	0.086
SC01	0.625	0.096
SC21	0.125	0.05
SC03	0.125	0.087

*Frecuencias tomadas de 200 individuos normales (112, 113).

C4A y/o C4B y 15 (93.8%) sin alelos nulos (tabla 17).

La tabla 18 muestra los haplotipos de los ocho individuos con el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario. Como se puede ver, en algunos casos no fue posible tipificar todos los marcadores del CPH (pacientes 5, 7 y 8). La tabla nos muestra los marcadores del CPH tipificado, tanto para moléculas clase I, como para clase II y III.

La segregación de los marcadores del CPH en los pacientes con el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario se muestra en los árboles genealógicos de sus familias (figuras 8, 9, 10, - 11, 12 y 13).

TABLA 17.

COMPLOTIPOS Y SU RELACION CON POSITIVIDAD A ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA EN PACIENTES CON LEG.

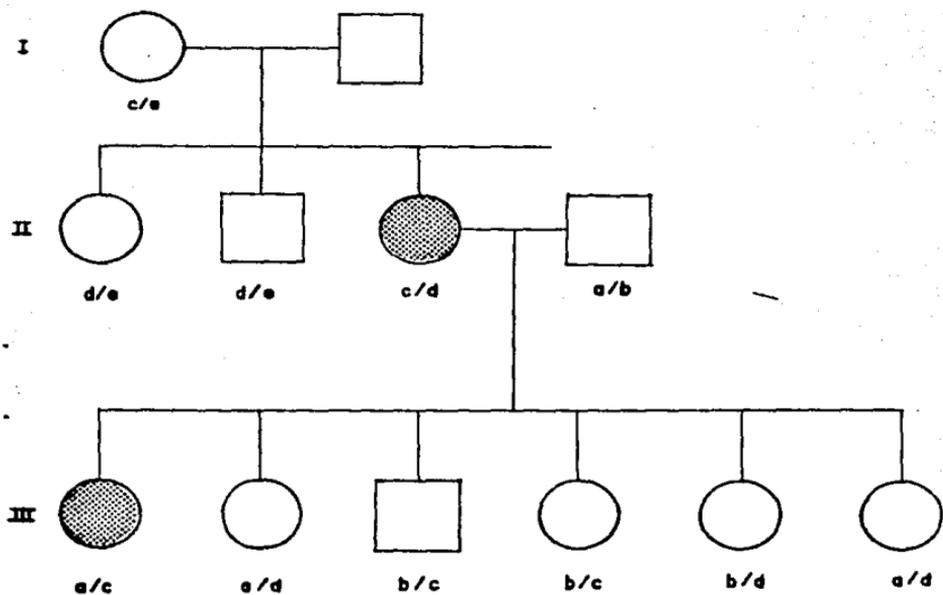
Complotipos	Pacientes con LEG	
	aCL(+)	aCL(-)
SC01/SC31	8	1
SC42	3	-
SC30	2	-
FC31	2	-
FC30	1	-
SC30/SC31	4	-
FC01	2	-
FC31	1	-
SC21	1	-
FC30/SC31	2	-
FC01/SC33	1	-
% DEL TOTAL	55.1	6.2
SC31/SC31	5	6
FC31	3	-
SC42	2	1
OTROS/OTROS	12	8
% DEL TOTAL	44.9	93.8

TABLA 18.

HAPLOTIPOS DE LOS PACIENTES CON SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS "PRIMARIO"

Paciente	Haplotipo
1	A2B5DR4SC31 A1B17DR7DQ2FC31
2	A2B5DR10SC01 A2B5DR4SC01
3	A1B17DR10DQ1FC31 A2B7DR2DQ1SC01
4	A1B50DR7SC31 A28-DR1SC31
5	A1B50DR7SC31 -B35SC01
6	A2B16DR4DQ3SC31 A2B15DR6DQ1SC21
7	A2B35DR8SC03 - - DR4DQ3SC31
8	- - DR7DQ2SC01 A2B16DR5DQ1SC31

ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA I

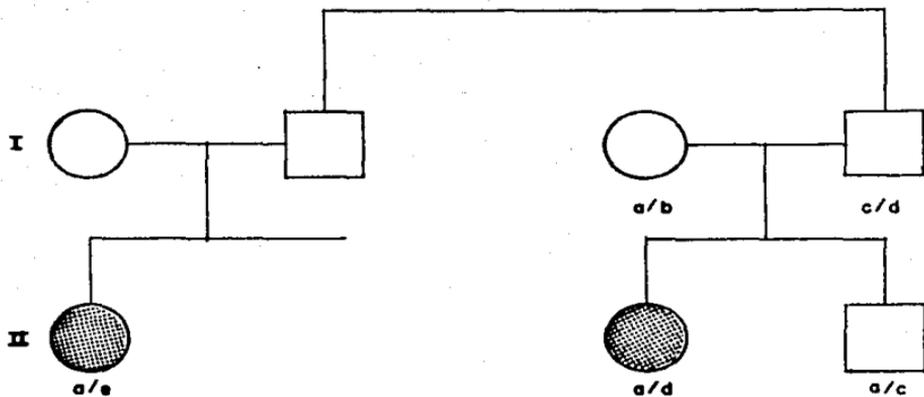


- Haplotipos
- a) A2B5DR10SC01
 - b) A2B45DR7SC31
 - c) A2B5DR4SC31
 - d) A1B17DR7DQ2FC31
 - e) AXBXDR7SC01

● Síndrome de anti-fosfolípidos "primario"

Figura 8

ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 2



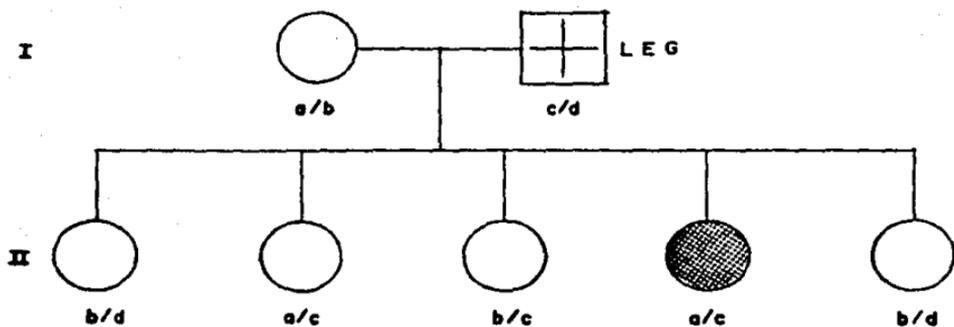
Haplotipos

- a) A1B50DR7SC3I
- b) A9B35DR4SC3I
- c) A2B5DR2SC3I
- d) AXB35DRXSCOI
- e) AXB35DRXSCOI

● Síndrome de anti-fosfolípidos "primario"

Figura 9

ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 3



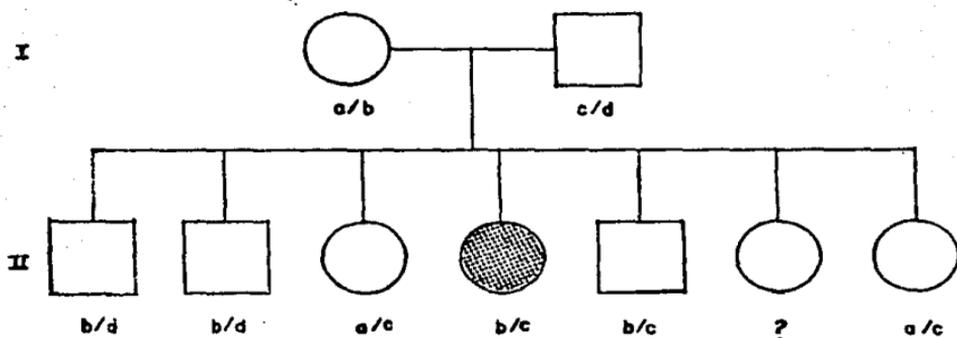
Haplotipos

- e) A1B17DR10DQ1FC3I
- b) A1B27DR1DQ1SC3I
- c) A2B7DR2DQ1SC0I
- d) A9B12DR7DQ2SC3I

● Síndrome de anti-fosfolípidos "primario"

Figura 10

ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 4



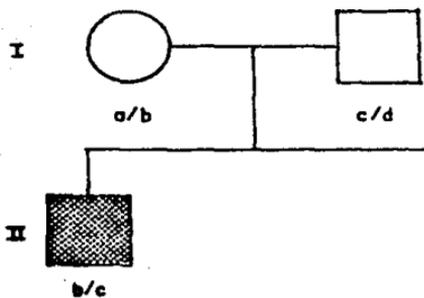
Haplotipos

- a) AXBI4DR3DQ2SC2I
- b) A2B35DRBSC03
- c) AXBXDR4DQ3SC3I
- d) AIB4ODRXSC33,0

● Síndrome de anti-fosfolípidos "primario"

Figura 11

ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 5



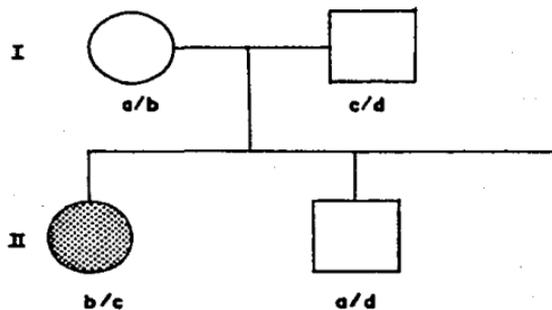
Haplotipos

- a) AX8XDR5DQ2SC33
- b) A2B16DR4DQ3SC31
- c) A2B15DR6DQ1SC21
- d) AXB14DR10Q1SC31

● Síndrome de anti-fosfolípidos "primario"

Figura 12

ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA 6



Haplotipos

- a) A2B12DR5DQ3FC30
- b) AXBXDR7DQ2SC01
- c) A2B16DR5DQ1SC31
- d) A28B40DR4DQ3SC31

● Síndrome de anti-fosfolípidos "primario"

Figura 13

7. DISCUSSION.

Los valores obtenidos por estudio de la población normal, sirvieron como control para la detección de anticuerpos aCL de las clases IgG e IgM en individuos con LEG y síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario. Aunque la forma de obtener los valores es un tanto arbitraria, es válida porque funciona operativamente, ya que permite diferenciar a la población normal de aquellos individuos que presentan las características clínicas de la presencia de los anticuerpos anti-fosfolípidos. Como se puede ver, en la población normal existen individuos positivos (en un 5.0%) para anticuerpos aCL, con índices anormales pero sin rasgos clínicos de daño o alteración por su presencia.

En el LEG se ha reportado que los anticuerpos anti-fosfolípidos tienen una prevalencia del 23.0%; en otros estudios reportan frecuencias de 42.0% (39, 66). En un estudio realizado en el INNSZ con 500 pacientes con LEG, se detectaron anticuerpos aCL en 45.0% de estos. Esta cifra concuerda con muchos de los reportes de estudios de anticuerpos anti-fosfolípidos. Dada la frecuencia de estos, podrían ser un buen marcador para la prevención de los daños a los que se han asociado, como son: trombosis, trombocitopenia, pérdida fetal recurrente y desórdenes neurológicos. Además, otros autoanticuerpos, como los AAN, se encuentran en la mayoría de los pacientes con desórdenes autoinmunes, no así los anticuerpos anti-fosfolípidos, por lo que su detección puede ser una prueba orientadora del problema.

En el estudio familiar realizado en los pacientes con LEG para las moléculas del CPH y anticuerpos aCL, se pudieron clasifi-

sicar los resultados en tres grupos que son: pacientes positivos familiares positivos; pacientes negativos-familiares positivos y pacientes negativos-familiares negativos. Algunos estudios apoyan el hecho de la asociación de alelos nulos en C4 con positividad a anticuerpos aCL, lo que explica en parte los grupos obtenidos del análisis de las moléculas del CPH que es bien distinguible desde el punto de vista de alelos nulos en los pacientes y en algunos miembros de los familiares que han presentado positividad al anticuerpo sin características de la enfermedad, que pueden estar ausentes porque no existe la interacción con el agente que hace que se dispare la respuesta inmune en contra de los componentes propios, en este caso los fosfolípidos, que se sabe, están ampliamente distribuidos en todo el organismo.

En los familiares de los pacientes con LEG, el 8.02% tuvieron anticuerpos aCL positivos, dato muy parecido a la positividad de otros autoanticuerpos en los familiares. También se observó que la positividad al anticuerpo tiene asociación con la presencia de alelos nulos tanto en pacientes como en familiares.

En el grupo control de sueros normales estudiado para obtener los valores de los índices normales, no se observó que existiesen pacientes con anticuerpos aCL con índices elevados, mientras que en el estudio de familias de pacientes con LEG se observan índices hasta de más de 5 D.E. principalmente de la clase IgG. De estos individuos, ninguno tiene haplotipos normales, es decir, tienen alelos nulos o son portadores de haplotipos extendidos. Es importante hacer notar que son individuos genéticamente suscep

tibles de desarrollar LEG, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario o alguna otra enfermedad autoinmune asociada a la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos.

Para corroborar lo anterior, estos sujetos deberán ser estudiados más de cerca. En el supuesto de que lo anterior ocurra, los individuos con posibilidad de desarrollar desórdenes autoinmunes por su predisposición genética, pueden ser controlados desde el inicio de la enfermedad y las alteraciones fisiológicas podrán ser en todos los casos reversibles, ya que un control temprano de la enfermedad compromete a menos órganos.

El tratamiento inmunosupresor modifica en algunos casos los índices de anticuerpos aCL, pero en otros los índices no se ven alterados, como en el caso del paciente masculino del estudio, que a pesar del tratamiento, sus índices no han sufrido cambios a todo lo largo de su seguimiento. Sin embargo, tres pacientes desde el momento de su ingreso no aumentaron sus índices de anticuerpo, permaneciendo normales hasta la fecha. Es importante el hecho de que índices mayores a 5 D. E. de anticuerpos aCL, en su mayoría están dados por inmunoglobulinas de la clase IgG, aunque también aparecen IgM pero con menor frecuencia. El análisis de positividad con respecto al sexo, muestra que individuos del sexo masculino, presentan anticuerpos aCL con índices mayores a 5 D. E. preferentemente de la clase IgG, mientras que en el sexo femenino la presencia de IgG, IgM o ambas altas mayores a 5 D.E., tienen casi la misma frecuencia.

En el estudio de las moléculas del CPH en pacientes con el -

síndrome de anti-fosfolípidos primario, lo primero que se puede observar es la presencia del marcador DR7 que en pacientes con LEG no existe, mientras que en los pacientes con el síndrome, el 50% de estos son portadores de dicho marcador. La frecuencia del DR7 en los pacientes con el síndrome primario está aumentada comparada con la frecuencia del marcador en la población en general.

Por otro lado, existe un aumento en la frecuencia de alelos nulos en C4A, preferentemente en el complotipo SC01. El alelo nulo en C4A solo, se encuentra aumentado comparado con la población normal y aun más, el alelo nulo en el complotipo SC01 también se encuentra aumentado en frecuencia con respecto a la de la población normal, hecho que sugiere una posible participación entre el complotipo SC01 y la fisiopatología de la enfermedad. El haber encontrado aumentados el DR7 y el alelo nulo en C4A preferentemente en el complotipo SC01, se puede pensar que de alguna manera DR7 SC01 pueden estar involucrados en la fisiopatología de la enfermedad. De hecho, siete pacientes de los ocho estudiados tienen alelos nulos en C4A o haplotipo extendido, fenómeno que se conoce está asociado con autoinmunidad en pacientes mexicanos.

El aumento en la frecuencia del DR7, sugiere también que la molécula clase II con este fenotipo en los pacientes con síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario está alterada desde el punto de vista estructural, modificando con ello la respuesta inmune.

Los datos obtenidos se emplearon para estudiar una posible -

asociación de los genes de la región cromosómica del CPH, que - por alguna razón se involucran con la presencia de la enfermedad, esto aunado a los factores ambientales, que hacen susceptibles a los portadores de los genes atípicos a padecer la enfermedad en estudio.

El presente estudio deja muchos caminos abiertos para la investigación de los anticuerpos anti-fosfolípidos y su asociación con las moléculas del CPH. Una de las cosas que saltan a la vista, es que sorprendentemente los familiares de los pacientes con el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario tuvieron - menos positividad al anticuerpo aCL (cero por ciento) que la esperada según lo anterior, ya que en la población normal estudiada, 5.0% de esta presenta índices anormales (menores de 5 D.E.). Los familiares de pacientes con LEG, 8.02% presentan índices -- anormales y 4.0% de los familiares de pacientes con EMTC tienen índices anormales (105). Lo anterior nos sugiere que el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario es posiblemente una entidad patológica autoinmune diferente del LEG y la EMTC. Es - necesario tomar en cuenta que las poblaciones estudiadas de LEG y síndrome de anti-fosfolípidos primario, son muy diferentes en tamaño, por lo que para confirmar que el síndrome es una entidad patológica diferente al LEG, se debe reunir una población mayor de pacientes con el síndrome de anti-fosfolípidos primario, para de esta manera estudiar a las dos enfermedades con pruebas estadísticas que comparen dos poblaciones de igual tamaño.

8. CONCLUSIONES .

1. Ninguno de los familiares con el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario presenta anticuerpos anti-cardiolipina positivos. Comparado esto con los estudios realizados en familiares de pacientes con LEG y EMTc, nos hace pensar que el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario es una entidad patológica diferente a las mencionadas.

2. Existe una asociación importante entre la presencia de -- alelos nulos en C4 (C4A y C4B) con la positividad a anticuerpos anti-cardiolipina, tanto en el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario como en el LEG.

3. El aumento en la frecuencia del complotipo SC01, no sólo por el aumento en la frecuencia del alelo nulo en C4 sino en el conjunto de genes estudiados que conforman las moléculas clase III, nos hace pensar en la posible asociación del complotipo - SC01 con la fisiopatología del síndrome de anti-fosfolípidos.

4. El marcador DR7 que se encuentra aumentado en los pacientes con el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario con respecto a la población en general, y que además no aparece en pacientes con LEG, es un marcador genético que confirma que el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos es una entidad patológica autoinmune particular.

5. Con el aumento en la frecuencia del DR7 y el complotipo SC01, se propone un desequilibrio de unión entre el marcador - clase II y las moléculas clase III, que participan en la fisiop atología del síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos prima- rio.

G L O S A R I O

Alelo: Formas aleatorias de un gen.

Allotipo: Diferencia antigénica genéticamente determinada sobre las proteínas sericas que varían en miembros diferentes de la misma especie.

Anafilotoxina: Sustancia producida por activación del complemento que produce el aumento de la permeabilidad vascular, a través de la liberación de mediadores farmacológicamente activos provenientes de las células cebadas.

Anticuerpo: Proteína producida como resultado de la introducción de algún antígeno y que tiene la capacidad para combinarse con el antígeno que estimuló su producción.

Anticuerpos antinucleares (AAN): Anticuerpos que son dirigidos contra los constituyentes nucleares, habitualmente las nucleoproteínas y que se encuentra en diversas enfermedades reumáticas.

Antígeno: Sustancia que puede inducir una respuesta inmunitaria localizable cuando es introducida en un animal.

Antígeno clase I: Antígeno de histocompatibilidad codificado en seres humanos por los loci A, B, C y en ratones por los loci D y K.

Antígenos clase II: Antígenos de histocompatibilidad codificado en seres humanos por los loci DR, DP, DQ y Dy en ratones por el locus I y otros loci.

Antígeno clase III: Componentes fB, C2 y C4 del complemento.

Autoanticuerpos: Anticuerpos contra autoantígenos.

Autoantígenos: Antígenos propios.

Autoinmunidad: Inmunidad contra autoantígenos.

Asociación genética: Término usado que describe la condición de que un genotipo particular esté relacionado con otro fenómeno, tal como enfermedades particulares.

Cardiolipina: Fosfolípido derivado del corazón de buey, componente de la membrana mitocondrial, que sirve como sustrato de antígenos para las reagentas.

Centimorgan: Unidad de longitud física en el mapa de un cromosoma que equivale a una frecuencia de 1% de la recombinación entre genes estrechamente ligados. También se le llama unidad de mapeo.

Clase de inmunoglobulina: Subdivisión de las moléculas de inmunoglobulina, basada en los determinantes antigénicos de la región Fc de las cadenas H. En el hombre hay cinco clases de inmunoglobulina designadas como: IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE.

Complejo inmune: Producto de la reacción antígeno-anticuerpo, la cual puede también contener componentes del sistema del complemento.

Complejo principal de histocompatibilidad (CPH): Número aún no determinado de genes localizados cerca uno del otro, que determinan los antígenos de histocompatibilidad de los miembros de una especie.

Complemento: Sistema de proteínas séricas que es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpos.

Complotipo: Haplotipo del sistema del complemento.

Cromosoma: Cuerpo nucleoprotéico microscópicamente observable, se tiñe oscuro con los colorantes básicos en las moléculas durante la división celular. Portadores de la herencia.

Desequilibrio de unión o enlace: Condición por la cual dos genes se presentan combinados en la población con una frecuencia más alta que la que se esperaría dadas sus frecuencias individuales.

Difusión doble de Ochterlony: Técnica de inmuno precipitación en la cual el antígeno y el anticuerpo difunden uno hacia el otro y forman complejos inmunes en agar.

Electroforésis: Separación de moléculas en un campo eléctrico.

Electroforésis por inmunofijación: Técnica para identificar proteínas mediante separación electroforética en un gel seguido de precipitación "in situ" con anticuerpos específicos.

Fijación de complemento: Análisis estándar del suero usado para demostrar una reacción antígeno-anticuerpo en la cual el anticuerpo se ha fijado como resultado de la formación de complejos inmunes. La incapacidad posterior de la lisis de eritrocitos sensibilizados por el complemento que ha sido fijado indica el grado de la reacción antígeno-anticuerpo.

Gammaglobulinas: Proteínas del suero con movilidad gamma en la electroforésis que comprenden la mayoría de las inmunoglobulinas y anticuerpos.

Gen: Porción de material genético que codifica para una proteína.

- Gen nulo:** Porción de material genético que no codifica para proteína.
- Haplotipo:** Porción del fenotipo determinada por genes íntimamente ligados de un solo cromosoma heredados de un solo progenitor.
- Herencia multigénica:** Herencia que depende de varios genes.
- Hibridoma:** Línea de células transformadas que crecen "in vivo" o "in vitro", la cual está constituida por un híbrido somático de dos líneas celulares progenitoras y contiene material genético de ambas.
- Hipocomplementemia:** Disminución en la concentración de las proteínas del sistema del complemento.
- Hipoprotrombinemia:** Disminución de la concentración de protrombina.
- Histocompatible:** Antígeno de transplante que es compartido.
- HLA (Antígeno leucocitario humano):** La mayor región genética de histocompatibilidad en el hombre.
- IgA:** Clase de inmunoglobulina que predomina en las secreciones.
- IgD:** Clase de inmunoglobulina que predomina en la superficie de los linfocitos B humanos.
- IgE:** Anticuerpo reagina involucrado en las reacciones de hipersensibilidad inmediata.
- IgG:** Clase de inmunoglobulina predominante en el suero humano.
- IgM:** Inmunoglobulina pentamérica que comprende aproximadamente 10% de las inmunoglobulinas del suero humano.
- Inmunolectroforesis:** Técnica que combina una separación electroforética inicial de las proteínas seguida por inmunodifusión con la formación de arcos de precipitación.
- Inmunofluorescencia:** Técnica histológica o citológica para la identificación y localización de antígeno en los cuales el anticuerpo específico es conjugado con compuestos fluorescentes, resultando un trazador sensible que puede detectarse por medición fluorométrica.
- Isotipo:** Características antigénicas de determinada clase o subclase de cadenas H y L de inmunoglobulina.

Ligamiento: Condición por la cual dos genes que están presentes muy proximalmente en un mismo cromosoma son heredados simultáneamente.

Loci: plural de locus.

Locus: Sitio específico de un gen sobre un cromosoma.

Opononina: Sustancia capaz de intensificar la fagocitosis. Los anticuerpos y el complemento son las dos opsoninas principales.

Oponización: Proceso por el cual es facilitada la fagocitosis por la disposición de opsoninas en el antígeno.

Polimorfismo: Cuando un locus puede presentar muchas variantes alelicas.

Proteína monoclonal: Proteína producida a partir de la progenta de una sola célula llamada clona.

Proteínas policlonales: Grupos de moléculas derivadas de clonas múltiples de células.

Quimiotaxis: Migración direccional de células particularmente en respuesta a un gradiente de concentración de ciertos factores quimiotácticos.

Reacción cruzada: Reacción de un anticuerpo con un antígeno diferente al que indujo su formación.

Reagina: Sinónimo de anticuerpo IgE. Denota también un anticuerpo fijador de complemento que reacciona en la prueba de Wassermann con el antígeno cardiolípina.

Recombinación: Proceso por el cual la información genética es rearmada durante la meiosis.

Síndrome: Cuadro o conjunto sintomático. Serie de síntomas y signos que existen a un tiempo y definen clínicamente un estado morboso determinado.

Trombosis: Proceso de formación o desarrollo de un tapón o trombo en los vasos sanguíneos.

Trombocitopenia: Disminución del número de plaquetas o aumento en la destrucción de éstas.

Vasospasmo: Espasmo vascular. Disminución del calibre de los vasos por influencia nerviosa o daño al endotelio vascular.

BIBLIOGRAFIA.

1. Fields TR, Zarrabi MH, Gerardi EN and Bennett RS. Reticuloendothelial system Fc receptor function in the drug induced -- Lupus Erythematosus Syndrome. J. Rheumatol. 13:726-731, 1986.
2. Vargas R, Aleman P. Lupus eritematoso sistémico inducido por etosuximida. Estudio de dos hermanas. Rev Mex IMSS. 23:787-291, 1985.
3. Alarcón-Segovia D, Fisbein E. Patterns of antinuclear antibodies and lupus activating drugs. J. Rheumatol. 2:167, 1985.
4. Alarcón-Segovia D. Drug induced lupus syndrome. Mayo Clin Proc. 10:345, 1969.
5. Alarcón-Segovia D, Wakin KG, Worthigton JW, et al. Clinical and experimental studies on the hidrolazine and it's relationship to systemic lupus erithematosus. Medicine (Baltimore). 46:1, 1967.
6. Playfair JHL. Immunology at a glance. Ed. Blackwell scientific. Pp. 30, 1979.
7. Harris EN, Gharavi AE and Hughes GRV. Anti-phospholipid antibodies. Clin Rheum Dis. 11:591-609, 1985.
8. Sánchez-Guerrero J, Delezé M, Alarcón-Segovia D. Síndrome de anti-fosfolípidos primario. XI Congreso Mexicano de Reumatología. Puebla 1988.
9. Harris EN, Hugues GRV and Gharavi AE. Antiphospholipid antibodies: An elderly statesman dons new garments. J. Rheumatol Supplement 13. 14:208-213, 1987.
10. Harris EN, Chan JKH, Asherson RA, et al. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. Predictive value of -- the anticardiolipin antibody test. Arch Inter Med. 146:2153-2156, 1986.
11. Wiedmann CE, Wallace DJ, Peter JB, et al. Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody isotypes in systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol. 15:74-79, 1988.
12. Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, et al. A molecular basis for MHC Class II-associated autoimmunity. Science. 240:1003-1009, 1988.
13. Grennan DM and Dyer PA. Immunogenetics and rheumatoid arthritis. Immunol Today. 9:33-35, 1988.
14. Catterall RD. Biological false positive reactions and - systemic disease. In Wlaker G (ed) Ninth on Advanced Medicine. pp 97-111, 1973. London: Pitman Medical.

15. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. Proc soc. Exp Biol Med (NY). 48:484-486, 1941.

16. Moore JE and Mohr CF. Biologically false positive serologic test for syphilis: type, incidence and cause. J. Am Med Assn. 150:467-473, 1952.

17. Nelson RA and Mayer MM. Immobilization of treponemal pallidum in vitro by antibody produced in siphylitic infection. J. Exp Med. 89:369, 1949.

18. Haserick JR and Long R. Systemic lupus erithematosus preceded by false-positive test for siphilis: presentation of five cases. Ann Int Med. 37:559-565, 1951.

19. Moore JE Lutz WB. The natural history of sistemic lupus erithematosus: an approach to it's through biologic false positive reactors. J. Chron Dis. 1:297-316, 1955.

20. Berglund S and Carlsson M. Clinical significance of Chro nic biologic false positive Wasserman reaction and 'antinuclear factors. Acta Med Scand. 180:407-412, 1966.

21. Harvey AM and shulman LE. Connective tissue disease and chronic biologic-positive test for siphilis (BFP reaction). Med Clin Nor Am. 50:1271-1279, 1966.

22. Putkonen T, Jokinen EJ and Mastakallio KK. Chronic biologic positive seroreactions for siphilis as a harbinger of syste mic lupus erithematosus. Acta Dermatovenerologica. 47:83-88, 1967.

23. Tuffanelli DL. False positive reactions for siphilis. Arch Dermatol. 98:606-611, 1968.

24. Harvey AM and Shulman LE. Systemic lupus erithematosus - and the chronic biologic false-positive test for siphilis. In Dubois E (Ed) Lupus erithematosus, 2nd Edition, pp. 196-209, 1974. Los Angeles: University of California Press.

25. Conley CL and Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated investigation. 31:621-622, 1952.

26. Frick PG. Acquired circulating anticoagulants in systemic 'collagen disease'. Autoimmune thromboplastin deficiency. Blood. 10:691-706, 1955.

27. Laurell AB and Nilsson IM. Hypergammaglobulinemia, circulating anticoagulant, and biological false positive Wasserman reaction: a study of two cases. J. Lab Clin Med. 49:694-707, - 1957.

28. Margolius A, Jackson DP and Ratnoff OD. Circulating anti-coagulants: a study of 40 cases and a review of the literature. *Medicine*. 40:145-202, 1961.
29. Scleider MA, Nachman RL, Jaffe EA and Coleman M. A Clinical study of the lupus anticoagulant. *Blood*. 48:499-509, 1976.
30. Shapiro S and Thiagaajan P. Lupus anticoagulant. *Prog Hemost Tromb*. 6:263-285, 1982.
31. Bowie WEJ, Thompson JH, Pascuzzi CA and Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J. Clin Inv*. 62:416-430, 1963.
32. Mueh JR, Herbst KD and Rappaport SI. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *Ann Int Med*. 92:156-159, 1980.
33. Williams H, Laurent R and Gibson T. The lupus coagulation inhibitor and venous thrombosis: a report of four cases. *Clin -- Lab Haematol*. 2:139-144, 1980.
34. Carreras LO and Vermuyen JG. 'Lupus' anticoagulant and - thrombosis-possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Hemost*. 48:28-40, 1982.
35. Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, et al. Thrombosis in SLE: striking association with the presence of circulating 'lupus anticoagulant'. *Brit Med J*. 287:1021-1023, 1983.
36. Elias M and Eldor A. Thrombembolism in patients with the 'lupus'-like circulating. *Arch Int Med*. 144:510-515, 1984.
37. Hughes GRV. Thrombosis, abortion cerebral disease and the lupus anticoagulant. *Brit Med J*. 287:1088-1089, 1983.
38. Thiagarajan P, Shapiro SS and De Marco L. Monoclonal immunoglobulin M coagulation inhibitor with phospholipid specificity-mechanism of a lupus anticoagulant. *J. Clin Invest*. 66:397-405, 1980.
39. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. iii:1211-1214, 1983.
40. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RS, et al. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 46:1-6, 1987.
41. Harris EN, Ioizou S, Englert H, et al. Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant. *Lancet*. iii:1099, 1984.

42. Harris EN, Gharavi AE, Loizou S, et al. Cross-reactivity of antiphospholipid antibodies. *J. Clin Lab Immunol.* 16:1-6, - 1985.
43. Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, et al. Affinity purified anticardiolipin and anti-DNA antibodies. *J. Clin Lab Immunol.* 17:155-162, 1985.
44. Velkamp JJ, Kerkhoven P and Loeliger EA. Circulating anticoagulant in disseminated lupus erythematosus: propose mode of action. *Haemostasis.* 2:253-259, 1974.
45. Lechner K. A new type of coagulation inhibitor. *Thromb Diath Haemorrh.* 21:487-499, 1969.
46. Lechner K. Acquired inhibitors in autoimmunity and isoimmune disease. *Thromb Diath Haemorrh. Supplement.* 45:227-241, - 1971.
47. Feinstein DI and Rappaport SI. Acquired inhibitors of -- blood coagulation. In Spaet TN (Ed). *Progress in Haemostasis - and Thrombosis*, 1st Editions, pp 75-95, 1972. New York: Grune and Stratton.
48. Exner T, Rickard KA and Kronenberg H. Studies on phospholipids in the action of a lupus coagulation inhibitor. *Pathology.* 7:319-328, 1975.
49. Shapiro S, Thiagarajan P and Mc Cord S. The specificity of lupus anticoagulants. *Eur J. Rheum.* 1984.
50. Yin ET and Gaston LW. Purification and kinetic studies - on a circulating anticoagulant in a suspected case of lupus erythematosus. *Thromb Diath Haemorrh.* 14:88-115, 1965.
51. Lafer EM, Rauch J, Andersejewski C, et al. Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides antiphospholipids. *J. Exp Med.* 153:897-909, 1981.
52. Koike T, Maruyama N, Funaki H, Tomiaka H and Yoshida S. Specificity of mouse hybridoma antibodies to DNA. II. Phospholipid reactivity and biological false positive serological test for siphilis. *Clin Exp Immunol.* 57:345-350, 1984.
53. Shoenfeld Y, Rauch J, Massicotte H, et al. Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies produced by human-human hybridomas. *N Engl J Med.* 308:414-420, 1983.
54. Rauch J, Tannenbaum H, Stollar BD and Swarcz RS. Monoclonal anticardiolipin antibodies bind DNA. *Eur J Immunol.* 14:529-534, 1984.

55. Schwarz RS. Monoclonal lupus autoantibodies. Immunol today. 4:68-69, 1983.

56. Schwarz RS and Stollar BD. Origins of anti-DNA autoantibodies. J Clin Invest. 75:321-327, 1985.

57. Inoue K and Nojima S. Immuno-chemical studies of phospholipids. I. reactivity of various synthetic cardiolipin derivatives with Wasserman antibody. Chem Phys Lip. 1:360-367, 1967.

58. Inoue K Nojima S. Immuno-Chemical studies of phospholipids. IV. The reactivities of antisera against natural cardiolipin and synthetic cardiolipin analogues-containing antigens. Chem and -- Phys Lip. 3:70-77, 1969.

59. Koskela P, Vaarala O, Makitalo R, Palosuo T and Aho K. -- Significance of false positive syphilis reactions and anticardiolipin antibodies in a Nationwide series of pregnant women. J Rheumatol. 15:70-73, 1988.

60. Koike T, Seuishi M, Funaki M, et al. Antiphospholipids antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol. 6:193-199, 1984.

61. Fiumara NS. Biologic false-positive reaction for syphilis. N Engl J Med. 268:402-405, 1963.

62. Johansson EA Lasus A. The occurrence of circulating anti-coagulants in patients with syphilis and biologically false positive antilipoidal antibodies. Ann Clin Res. 6:105-108, 1974.

63. Labro MT, Andrieu M, Weber M and Homberg JC. A new pattern of non-organ and non-specie-specific anti-organelle antibodies detected by immunofluorescence: The mitochondrial antibody number 5. Clin Exp Immunol. 31:357-366, 1978.

64. Meroni PL, Harris EN, Brucato A, et al. Anti-mitochondrial type M5 and anticardiolipin antibodies in autoimmune disorders: studies on their association and cross-reactivity. Clin Exp Immunol. 67:484-491, 1987.

65. Green D, Hougie C, Kazmier FJ et al. report of the working party on acquired inhibitors of coagulation: studies of the lupus anti-coagulant, Thromb Haemost. 49:144-146, 1983.

66. Canoso RT and Sise HS. Chlorpromazine-induced lupus anticoagulant and associated immunologic abnormalities. Am J Haemat. 13:121-129, 1982.

67. Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, et al. Affinity-purified anticardiolipin and anti-DNA antibodies. J. Clin Lab Immunol.

17:155-162, 1985.

68. Colaco CB and Male DK. Anti-phospholipid antibodies in -- syphilis and thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol.* 59:499-456, 1985.
69. Asherson RA, Mackworth-Younh CG, Boey ML, et al. Pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus, *Brit Med J.* 287: 1024-1025, 1983.
70. Glueck HI, Kant KS, Weiss MA, et al. Thrombosis in systematic lupus erythematosus: relation to the presence of circulating anticoagulants. *Arch Intern Med.* 145:1389-1395, 1985.
71. Hamsten A, Norberg R, Bjorkholm M, et al. Antibodies to -- cardiolipin in young survivors of myocardial infarction an association with the cardiovascular events. *Lancet.* i:113-115, 1986.
72. Hamsten A, Norbert R, Bjorkholm M et al. Antibodies to -- cardiolipin in young survivors of myocardial infarction: an association with recurrent cardiovascular event. *Lancet.* i:113-115, 1986.
73. Carrera LO and Vermylen JG. Lupus anticoagulant and thrombosis: possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Haemost.* 48:38-40, 1982.
74. Lubbe WF, Palmer SJ, Butler WS, et al. Fetal survival after prednisolone suppression of maternal lupus anticoagulant. *Lancet.* i:1361-1363, 1983.
75. Sangelippo MJ and Daryna CJ. Prekallikrein associated -- with the lupus anticoagulant. *Am J Clin Pathol.* 77:275-279, 1982.
76. Ford PM, Ford SE and Lillicrap DP. Association of lupus anticoagulant with severe valvular heart diseases in systemic -- lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 15:597-600, 1988.
77. Careras LO, Defrey G, Machin SJ, et al. arterial thrombosis, intrauterine death and "lupus" anticoagulant: detection of immunoglobulin interfering with prostacyclin formation. *Lancet.* i:244-246, 1981.
78. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS and Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anti -- coagulants. *Blood.* 70:69-76, 1987.
79. Angeles-Cano E, Sultan Y and Clauvel P. Predisposing factors to thrombosis in systemic lupus erythematosus: possible relation to endothelial cell damage. *J Lab Clin Med.* 94:313-323, 1979.

80. Comp PC, De Bault LE, Esmon NL, et al. Human thrombomodulin is inhibited by IgG from two patients with nonspecific anticoagulants, abstracted. *Blood*. 62:299, 1983.

81. Canoso RT, Sise HS. Chlorpromazine-induced lupus anticoagulant and associated immunologic abnormalities. *Am J Hematol*. 13:121-129, 1982.

82. Zarrabi MH, Zucker S, Miller F, et al. Immunologic and coagulation disorders in Chlorpromazine treated patients. *Ann Intern Med*. 91:194-199, 1979.

83. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, et al. Isotype distribution and phospholipid specificity in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 44:281-283, 1985.

84. Lubbe WF, Butler WS, Palmer SJ, et al. Lupus anticoagulant in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 91:357-363, 1984.

85. Lockshin MD, Druzin ML, Goei S, et al. Antibody to cardiolipin is a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N engl J Med*. 313:152-156, 1985.

86. Harris EN, Asherson Ra, Gharavi AE, et al. Thrombocytopenia in SLE and related autoimmune disorders: association with anticardiolipin antibodies. *Br J Haematol*. 59:227-230, 1984.

87. Harris EN, Gharavi AE, Hegde U, et al. Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 59:231-234, 1984.

88. Delezé M, Oria CV and Alarcón-Segovia D. Occurrence of both hemolytic anemia and thrombocytopenic purpura (Evan's syndrome) in systemic lupus erythematosus. Relationship to anticardiolipin antibodies. *J Rheumatol*. 15:612-615, 1988.

89. Weinstein C, Miller MH, Axtens R, et al. Livedo reticularis associated with increased titers of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol*. 123:596-600, 1987.

90. Hughes GRV, Harris EN and Gharavi AE. The cardiolipin syndrome. *J Rheumatol*. 13:486-489, 1986.

91. Mc Hugh Nj, Maymo J, Skinener RP, James I and Maddison PJ. Anticardiolipin antibodies, livedoreticularis and cerebrovascular and renal diseases in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum*. 47:110-115, 1988.

92. Harris EN, Gharavi AE, Asherson RA, et al. Cerebral infarction in systemic lupus: Association with anticardiolipin antibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2:47-51, 1984.

93. Harris EN, Gharavi AE, Mackworth-Young CG, et al. Lupoid sclerosis: a possible pathogenic role for antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis.* 49:281-283, 1985.
94. Scleider MA, Nechman RL, Jaffe EA, et al. A clinical study of the lupus anticoagulant *Blood.* 48:499-509, 1976.
95. Hazeltine M, Rauch J, Danoff D, et al. Antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus: evidence of an association with positive Coomb's and hypocomplementemia. *J Rheuma - tol.* 15:80-86, 1988.
96. Norber R, Gardlund B, Thorstensson R, et al. Further -- immunological studies of sera containing anti-mitochondrial antibodies, type M5. *Clin Exp Immunol.* 58:639-644, 1984.
97. Loeliger A. Prothrombin as a cofactor of circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus. *Thromb Diath Haemorrh.* 3:237-256, 1959.
98. Yin ET and Gaston LW. Purification and kinetic studies on circulating anticoagulant in a suspected case of lupus erythematosus. *Thromb Diath Haemorrh.* 14:88-115, 1965.
99. Rivard GE, Schiffman S and Rappaport SI. Cofactor of the lupus anticoagulant. *Thromb Diath Haemorrh.* 32:554-563, 1974.
100. Awdwh ZL, Raum D, Yunis EJ and Alper CA. Extended HLA - complement-glyoxalase allele haplotypes: evidences for T/t-like complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:259-263, 1983.
101. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, et al. Genes for the tumor necrosis factor alpha and beta are linked to the human Major Histocompatibility Complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:8699-8702, 1986.
102. Strachan T. Molecular genetic and polymorphism of class I HLA antigens. *Br Med Bull.* 43:1-14, 1987.
103. Maloy WL. Comparison of the primary structure of class I molecules. *Immunol Res.* 6:11-29, 1987.
104. Zinlernagel RM and Doherty PC. Major transplantation - antigens, viruses, and specificity of surveillance T-cells: the "altered self" hypothesis. *Contemp Topics Immunobiol.* 7:179-185, 1977.
105. Gorski BMJ, Rollini P, Berte C, et al. Polymorphism and regulation of HLA class I genes of the Major Histocompatibility Complex. *Biology.* 51:67-74, 1986.
106. Schrieber RD and Muller-Eberhard HJ. *J. Exp Med.* 140: 1324-1335, 1974.

107. Voller A, Bidwell DE and Bartlett A. The enzyme linked - immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine, The Zoological Society of London, Regent's Park, London NW1. Ed Dyna - tech Laboratories, INC. 1979.

108. Edward T. Enzyme-Immunoassay. Technical Development and planning scripps-miles, INC. Adjunct associated member. Department of pathology. Scripps clinic and research fundation. La Jolla, California. Ed. CRC, INC, Boca Raton, Florida, 1980.

109. Harris EN Gharavi AE, Patel SP and Hughes GRV. Evaluation of the anticardiolipin antibody test: Report of an International Workshop held 4 april 1986. Clin Exp Immunol. 68:215-222, 1987.

110. Loizou S, McCrea JD, Ridges AC, et al. Measurement of - anticardiolipin by an Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin Exp Immunol. 62: 738-745, 1985.

111. Cardiel M, Delezé M, Oria CV, Cabiedes J, Loeza F y Alarcón-Segovia D. Relacion entre presencia de nefropatía y anticuerpos anti-cardiolipina en enfermedad mixta del tejido conectivo - (EMTC). XI Congreso Nacional de Reumatología. Puebla, 1988.

112. Granados J. Olivares I, Melin A y col. Distinción de la población normal mexicana mediante marcadores genéticos. Importancia para el estudio de las enfermedades reumáticas. Rev Mex. - Reumat. 1:81-84, 1986.

113. Selman M Tean L, Mendoza A, et al. Increase of HLA-DR7 in pigeon Breeder's lung in a Mexican population. Clin Immunol - Immunopath. 44:63-70, 1987.

114. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, et al. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. Clin Exp Immunol. 69:557-565, 1987.

115. Stites DP, Fudenberg HH, Stobo JD and Wells JV. Inmunología Básica y Clínica. Quinta Edición. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México D. F. 1985.

116. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 25:1271-1277, 1982.

117. Alarcón-Segovia D. Pathogenetic potential of antiphospholipid antibodies. J. Rheumatol. 15:890-893, 1988.