

11  
207  
Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina  
Programa Universitario de Investigación en Salud.

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Médicas.

**PAPEL DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO EN RELACION CON  
TROMBOCITOPENIA EN SINDROME ANTIFOSFOLIPIDO PRIMARIO, LUPUS  
ERITEMATOSO GENERALIZADO Y PURPURA TROMBOCITOPENICA  
IDIOPATICA.**

Departamento de Inmunología y Reumatología  
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Tutor: Dr. Donato Alarcón-Segovia.

Alumna: N. Janitzia Vázquez-Mellado Cervantes.

México, D.F. mayo 1992.



## **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.

# I N D I C E

---

	<u>página</u>
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	7
III. HIPOTESIS	8
IV. SUJETOS	8
V. METODOS	11
VI. RESULTADOS	17
VII. DISCUSION	22
CUADROS	
FIGURAS	
REFERENCIAS	

---

## I. INTRODUCCION.

El síndrome de anticuerpos antifosfolípido se ha definido durante los últimos años y se caracteriza por la presencia de anticuerpos antifosfolípido (aFL) en suero y tendencia a trombosis de repetición, abortos recurrentes, trombocitopenia y otras manifestaciones clínicas relacionadas (1-3). A este síndrome se le llamó síndrome de anticuerpos anticardiolipina (4-6) y posteriormente síndrome de anticuerpos antifosfolípido ó simplemente, síndrome antifosfolípido (7-10) ya que se observó que los anticuerpos tienen reactividad cruzada con otros fosfolípidos además de cardiolipina (CL) (8,10). El síndrome fue descrito originalmente en pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) (1-11) y se le denomina síndrome antifosfolípido secundario ó asociado a LEG. Sin embargo puede ocurrir en pacientes sin evidencia clínica ó serológica de LEG u otras enfermedades, a este grupo se le llama Síndrome antifosfolípido primario (SAFP) (12-14). Además de los diversos estudios de asociación estadística entre los aFL y manifestaciones clínicas (1-11), se ha tratado de definir si dichos anticuerpos tienen un papel importante en la patogenia de las manifestaciones clínicas. si la causa tanto de los anticuerpos como de las manifestaciones son otros factores ó si se trata unicamente de un epifenómeno, resultante del daño tisular (16,17). Es probable que el papel de los aFL no sea el mismo en todas las manifestaciones clínicas asociadas (18).

Se han establecido criterios para el diagnóstico del síndrome antifosfolípido tanto primario (12) como secundario a LEG, se le denomina síndrome antifosfolípido a la presencia de dos ó más manifestaciones clínicas de las descritas como asociadas (cuadro 1) y títulos de anticuerpos anticardiolipina (aCL) por arriba de 5 desviaciones estándar de la media de los sujetos sanos (11). Sin embargo, hay un grupo de pacientes que cursan con las mismas manifestaciones clínicas asociadas a aFL en forma aislada y por otra parte, hay pacientes con títulos altos de aFL en suero sin manifestaciones clínicas asociadas, a este grupo muy interesante de pacientes se ha propuesto que les denomine como Síndrome antifosfolípido probable (18), aún no se

ha establecido cuántos de ellos durante su evolución reunirán criterios suficientes para síndrome antifosfolípido primario o secundario.

Las formas en las cuales se detectan los aFL actualmente son : VDRL falso positivo, anticoagulante lúpico y aCL por técnica de ELISA (19). En los pacientes con aFL es posible encontrar positividad en solo una o dos de las tres pruebas, lo cual habla tanto de la heterogeneidad de los antígenos utilizados en las pruebas como de la heterogeneidad de los mismos anticuerpos (19).

El VDRL es un antígeno complejo formado por cardiolipina, fosfatidilcolina y colesterol, es una técnica bien estandarizada en todo el mundo, pero es poco sensible para detectar aFL asociados a enfermedades autoinmunes (20).

El anticoagulante lúpico es una prueba muy útil, ya que además de la presencia de los anticuerpos nos habla de su función. en este caso de prolongar el tiempo parcial de tromboplastina. Sin embargo, es una prueba poco estandarizada pues hay diversos métodos de detectar anticoagulante lúpico, los cuales utilizan una cantidad variable de cardiolipina y fosfatidilserina como antígenos. Ninguno de los métodos es aceptado por todos los centros en que se estudian los aFL. Esta es una prueba poco sensible, pero parece ser muy específica para detectar aFL relacionados con la presencia de manifestaciones clínicas (21-25).

La técnica de ELISA es la prueba más utilizada para la detección de aFL en todo el mundo. está bien estandarizada, es muy sensible, particularmente cuando se usa cardiolipina como antígeno. sin embargo no distingue entre aFL de alta y baja afinidad (26,27).

Los aFL de isotipo IgG de los pacientes con LEG y SAPP se caracterizan por ser anticuerpos que reaccionan principalmente con cardiolipina y otros fosfolípidos de carga negativa como son fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (FI) y ácido fosfatídico (AF) y tienen poca o ninguna reactividad con fosfolípidos de carga neutra como fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) y esfingomielina (EM) (8,10). Sin

embargo, se ha descrito la relación entre aCL IgM y aFC IgM en pacientes con anemia hemolítica autoinmune (28,29)

Se ha establecido que algunos aFL pertenecen al grupo de anticuerpos denominados anticuerpos naturales (30,31), los cuales se encuentran en los individuos normales y tienen probablemente una función fisiológica, dichos anticuerpos pueden elevarse en respuesta a diversos estímulos particularmente de tipo infeccioso (cuadro 2). Dicha elevación es discreta y transitoria y es generalmente de isotipo IgM, aunque pueden ser IgG (32,33). Se ha postulado que en los pacientes con síndrome antifosfolípido sea este primario ó secundario a LEG puede haber cambios en el isotipo, en la afinidad y/o en los mecanismos de regulación de los aFL que den como resultado la presencia de aFL a títulos altos y que se asocien a las manifestaciones clínicas ya mencionadas (1-7,11,15). Los pacientes con sífilis tienen aFL, los cuales reaccionan mejor con el antígeno VDRL que con cardiolipina sola, no suelen comportarse como anticoagulante lupico, son de isotipo IgM inicialmente aunque también son IgG durante la evolución de la infección, reaccionan tanto con fosfolípidos negativos como con neutros (35-39) y no requieren de  $\beta 2$  glicoproteína I como cofactor para su detección, todas estas características los hace diferentes a los aFL de los pacientes con LEG y SAFL, y podrían estar relacionadas con la ausencia de manifestaciones clínicas asociadas a aFL en los primeros (40-41).

Las manifestaciones asociadas a aFL son de dos tipos: El primero relacionado con daño vascular y trombosis y el segundo relacionado con daño celular a eritrocitos y plaquetas (16,17,19).

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados de  $2\mu\text{m}$  de diámetro, que tienen una vida media de 8 a 10 días, tienen al menos tres tipos de organelos de almacenamiento: a) Los gránulos alfa es el sitio de almacenamiento de diversas proteínas específicas de las plaquetas y glicoproteínas que participan en los fenómenos de adherencia. b) Los cuerpos densos, son menos numerosos y son el sitio de almacenamiento de aminas vasoactivas, de las cuales la más importante es serotonina y c) Los lisosomas que contienen hidrolasas ácidas y neutras (42). Las plaquetas

participan en la respuesta inflamatoria y su función principal es en el proceso de coagulación. En condiciones fisiológicas circulan como plaquetas en reposo y de esa manera mantienen la homeostasis, sin embargo, son capaces de activarse a través de estímulos muy diversos (42).

El proceso conocido genericamente como activación plaquetaria involucra mecanismos de adhesión, agregación primaria y secundaria y secreción de sustancias de gránulos alfa, cuerpos densos y lisosomas. Estos tres mecanismos que están estrechamente relacionados entre sí, suceden en condiciones fisiológicas en forma secuencial, casi simultánea, sin embargo se ha demostrado que tienen mecanismos de regulación independiente, y que el trastorno de uno, no necesariamente impide que los otros se lleven a cabo (43-46).

Los fosfolípidos (FLs) de la membrana plaquetaria sufren uno de los diversos cambios descritos en las plaquetas durante el fenómeno de activación (47). Durante el reposo, se encuentran principalmente fosfolípidos de carga negativa en la superficie interna de la membrana plaquetaria y predominio de FLs de carga neutra en la superficie externa (48), durante el complejo proceso de activación se forman microvesículas de secreción, en los sitios de unión de éstas con la membrana plaquetaria se exponen los FLs de carga negativa en la superficie externa de la membrana y constituyen la mayoría de los FLs de la cara externa, mientras que los de carga neutra se encuentran en la superficie interna (49), de esta manera la membrana plaquetaria se convierte en una superficie procoagulante; probablemente con el fin de limitar el daño vascular, este proceso se regula a través de una translocasa de aminofosfolípidos que revierte este fenómeno, dejando nuevamente los fosfolípidos de la membrana como se encuentran durante el reposo (50,51).

La asociación entre trombocitopenia (TCP) y aFL es una de las más frecuentes en pacientes con síndrome antifosfolípido primario y secundario a LEG (3-7,11,52-54).

El 75% de los pacientes con LEG y trombocitopenia tienen títulos altos de aFL en suero, particularmente de isotipo IgG, los pacientes con LEG y títulos altos de aFL tienen un riesgo relativo de 2.06 (IC 95% 1.28-3.6) de tener TCP en algún momento durante su evolución (11). Alrededor del 50% de los pacientes con SAFP cursan con trombocitopenia (55,56).

Por otra parte, se han reportado aCL a títulos altos en el 30% de los pacientes con Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) (57) pero no se ha definido si durante su evolución estos pacientes llegan a reunir más criterios para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido primario (57).

Tanto los pacientes con LEG, como con PTI cursan con anticuerpos contra muy diversos antígenos plaquetarios como: HLA, Gp IIb/IIIa, Pblb y PL A1 (58-60).

Hasta el momento, no se han descrito otro tipo de autoanticuerpos en pacientes con SAFP (55,62) y por tanto se esperaría que estos pacientes son el grupo donde mejor se puede estudiar el papel de los aFL en trombocitopenia.

Dado que, la cardiolipina no es un antígeno de las membranas celulares, se ha propuesto que los aFL se unen a otros FLs de carga negativa en la membrana plaquetaria, como fosfatidilserina (FS) (63), sin embargo ésta únicamente se encuentra accesible en la superficie de la membrana durante la activación plaquetaria. Por lo tanto, se esperaría que aún cuando existan títulos altos de aFL, la unión de éstos a plaquetas pudiera estar determinada por la presencia ó no de la activación plaquetaria (64-71).

Algunos estudios previos han tratado de analizar este punto, los cuales han encontrado que hay unión de aFL a plaquetas. sin embargo hay controversia acerca de, si la unión es mayor a plaquetas activadas que a plaquetas en reposo (64,65,67,68,71), ó mayor a plaquetas lisadas que a plaquetas intactas (64,65). Dicha controversia es debida a que los estudios han tenido variaciones importantes en la forma en que se ha abordado el problema: Todos han utilizado sueros con títulos altos de aFL de pacientes con LEG y SAFP indistintamente, sin tomar en cuenta que en los primeros hay también otros anticuerpos anti-plaquetas (58,61), también se han usado aFL monoclonales (67,68), sin embargo, éstos son anticuerpos murinos que pueden ó no reconocer los mismos



La realización de estos tres trabajos se hizo con la valiosa colaboración de:

QFB.Javier Cabiedes Contreras

Dr. Antonio R. Cabral

Dr. Jorge Cortés

Dr. Luis Llorente Peters

## **II. OBJETIVOS.**

### **II.A. Determinación de aFL en suero.**

Determinar si la especificidad, títulos e isotipo de los aFL se relacionan con trombocitopenia en pacientes con SAFR, LEG y PTI.

### **II.B. Unión de aFL a plaquetas *in vivo*.**

Determinar si hay unión de aFL a plaquetas *in vivo* en pacientes con trombocitopenia autoinmune.

### **II.C. Unión de aFL a plaquetas *in vitro*.**

Determinar la posible unión de aFL a plaquetas *in vitro*, y determinar si dicha unión es mayor a plaquetas activadas que a plaquetas en reposo.

epítopes en la molécula de FLs que los aFL de los pacientes; los estímulos utilizados para activar las plaquetas también han sido diversos: ADP, epinefrina, trombina, acetato de forbol-miristato (64,65,67,68) y por último, no se ha evaluado si después de dichos estímulos las plaquetas efectivamente están activadas, únicamente se han realizado en algún estudio agregometrias, las cuales valoran únicamente agregación y no activación completa (65,70).

Por todo lo anterior, decidimos estudiar el papel de los aFL en relación con trombocitopenia (TCP) en pacientes con SAFF, los cuales parecen ser el grupo ideal ya que en ellos no se han descrito otros autoanticuerpos, pacientes con LEG en los que hay aFL estrechamente relacionados con TCP y PTI por ser pacientes con trombocitopenia autoinmune que constituye la única manifestación de su enfermedad y en quienes el papel de los aFL no ha sido bien establecido.

La tesis consta de 3 trabajos independientes, en los cuales se trata de estudiar el papel de aFL en relación a trombocitopenia abordando el problema desde tres aspectos:

**A: Determinación de aFL en suero:** En la cual se determinaron títulos e isotipo de aCL, aFS y anti-fosfatidilcolina (aFC) en pacientes con SAFF, en pacientes con LEG con síndrome antifosfolípido y sin síndrome antifosfolípido asociado y pacientes con PTI.

**B: Determinación de aFL unidos a plaquetas *in vivo*,** de pacientes con SAFF, LEG y síndrome antifosfolípido secundario y PTI los cuales se subclasificaron de acuerdo a la presencia de TCP al momento del estudio, antecedente de la misma ó sin TCP.

**C: Unión de aFL a plaquetas en reposo y activadas *in vitro*.** Se purificaron aFL de pacientes con SAFF y se evaluó la unión de éstos a plaquetas en reposo y activadas, de sujetos sanos.

### III. HIPOTESIS.

#### **III.A. Determinación de aFL en suero.**

Los títulos séricos de aCL, aFS y aFC no guardan relación con la presencia de trombocitopenia en pacientes con LEG , SAFP y PTI.

#### **III.B. Unión de aFL a plaquetas *in vivo*.**

Los pacientes con SAFP y trombocitopenia tienen con mayor frecuencia aFL unidos a plaquetas que los pacientes con SAFP sin trombocitopenia; lo anterior, también es posible que se observe, aunque en menor proporción en pacientes con LEG y PTI.

#### **III.C. Unión de aFL a plaquetas *in vitro*.**

Los aFL tienen capacidad de unirse a plaquetas. Es probable que los aCL y aFS se unan preferentemente a plaquetas activadas al comparar la unión de dichos anticuerpos a plaquetas en reposo.

### IV. SUJETOS .

#### **IV.A. Determinación de aFL en suero.**

Se incluyeron los datos de aquellos pacientes de los servicios de Reumatología y Hematología que cumplían con los siguientes criterios:

Las definiciones operacionales para los diagnósticos mencionados se encuentran en el anexo 1.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de LEG, SAFP y PTI con evolución mínima de la enfermedad de un año y seguimiento por parte de la institución mínimo de 6 meses,

que pertenezcan a alguno de los grupos abajo citados independientemente del tratamiento.

2. Pacientes de los grupos I a V (SAFP y LEG) de los cuales haya suero disponible en la Seroteca del Departamento de Inmunología y Reumatología del INNSZ.
3. Pacientes del grupo VI (PTI) que acudan a la consulta de Hematología del INNSZ.
4. En los grupos III y V en los cuales es requisito que los pacientes hayan cursado con trombocitopenia, que haya suero disponible en la seroteca del Departamento, que coincida  $\pm$  10 días con determinación de cuenta plaquetaria.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con diagnóstico dudoso ó que no tengan evolución y seguimiento mínimos.
2. Aquellos en los cuales no se cuente con mas de 500  $\mu$ l de suero en la seroteca.
3. Pacientes que, durante el cuadro de trombocitopenia existan dudas por parte del médico tratante sobre la causa de ésta.

Los pacientes incluidos se asignaron a cada uno de los siguientes grupos:

Grupo I. Pacientes con diagnóstico de SAFP que no hayan cursado con trombocitopenia durante su evolución (SAFP S)

Grupo II. Pacientes con diagnóstico de SAFP que hayan cursado con trombocitopenia durante su evolución (SAFP T)

Grupo III. Pacientes con diagnóstico de LEG y síndrome antifosfolípido secundario ó asociado que no hayan cursado con trombocitopenia durante su evolución. (LE APS)

Grupo IV. Pacientes con diagnóstico de LEG y síndrome antifosfolípido secundario ó asociado que hayan cursado con trombocitopenia durante su evolución. (LE APT)

Grupo V. Pacientes con diagnóstico de LEG que hayan cursado con trombocitopenia durante su evolución sin síndrome antifosfolípido asociado (LE T)

Grupo VI. Pacientes con diagnóstico de Púrpura trombocitopénica idiopática. (PTI)

#### IV.B. Unión de aFL a plaquetas *in vivo*.

Se estudiaron 78 pacientes en total. Treinta y seis tenían diagnóstico de LEG y síndrome antifosfolípido asociado, 21 tenían diagnóstico de SAFF y 21 pacientes con diagnóstico de PTI. Siete pacientes se estudiaron en dos ocasiones (3 LEG, 2 SAFF y 2 PTI) dando un total de 85 determinaciones.

Cada uno de los pacientes se subclasificó de acuerdo al número de plaquetas que tenían al momento del estudio en alguno de los siguientes grupos:

Con trombocitopenia. Aquellos que al momento del estudio tenían cuenta plaquetaria de menos de  $100 \times 10^9/L$  debido a actividad de la enfermedad, en ausencia de otras posibles causas.

Antecedente de trombocitopenia. Aquellos pacientes con cuenta plaquetaria mayor a  $150 \times 10^9/L$  al momento del estudio, pero historia de trombocitopenia por actividad de la enfermedad.

Sin trombocitopenia. Pacientes que no tuvieran trombocitopenia actual ni por historia.

También se estudiaron 16 voluntarios sanos como controles (según la definición operacional en anexo 1 ).

#### **IV.C. Unión de aFL a plaquetas *in vitro*.**

Se seleccionaron pacientes con diagnóstico de SAFP que acudieron a la consulta de Reumatología durante 1991 y cursaron con títulos altos de aCL ó aFS isotipo IgG.

También se incluyeron sujetos sanos según las definición de éstos que se encuentra en el anexo 1.

### **V. METODOS**

#### **V.A. Determinación de aFL en suero.**

##### **V.A.1. Revisión de expedientes.**

Se revisaron los expedientes de los pacientes con diagnóstico de SAFP ó LEG (grupos I a V) y se obtuvieron los siguientes datos de cada determinación de aCL en suero durante el seguimiento:

Fecha

Cuenta plaquetaria \*

Valores de aCL IgG e IgM

\*  $\pm$  10 días en relación con la fecha de determinación de aCL.

Seleccionamos en cada paciente, la muestra que tuviera el título mas alto de aCL y el suero correpondiente se utilizó para la determinación de aFS y aFC, según se describe mas adelante.

Los sueros utilizados forman parte de la Seroteca del Departamento y se encuentran almacenados a -70°C.

En los pacientes con PTI, se determinó aCL, aFS y aFC en la única muestra disponible.

#### **V.A.2. Determinación de aCL, aFS y aFC por ELISA.**

- Sensibilización de la placa. A una placa de 96 pozos se añaden 50 µl de solución etanol-cardiolipina a concentración de 43 ng/ml, de solución etanol-fosfatidilserina a concentración de 50ng/ml y de solución etanol-fosfatidilcolina a concentración de 50ng/ml respectivamente. El alcohol se evapora de la placa con nitrógeno gaseoso por 30 minutos. Para bloquear sitios inespecíficos de la placa, se añaden 350 µl de PBS-SBF 10% por pozo. La placa se incuba a temperatura ambiente por dos horas. Se lava 3 veces con 350 µl de PBS por pozo. Se escurre golpeandola sobre una superficie suave, se cubre con cinta adhesiva y se guarda a 4°C.

- Ensayo de sueros. A la placa sensibilizada se añaden 200 µl de solución 1:50 de suero problema en PBS-SBF 10% para aCL, 100 µl de solución 1:320 de suero problema en PBS-SBF 10% para aFS y 100 µl de solución 1:50 de suero problema en PBS-SBF 10% para aFC respectivamente, los sueros se ponen por duplicado en todos los casos y se incuba una hora a temperatura ambiente. A su vez se ponen en 3 puntos de la placa una mezcla de sueros normales "poza" que tiene como finalidad disminuir las variaciones del ensayo y proporcionar el valor de referencia del índice. La poza debe ir también a una dilución 1:50 en PBS-SBF 10%.

Cada placa lleva 6 pozos "blanco", los que dan la densidad óptica del antígeno, y siguen el mismo proceso a excepción del suero problema. Las placas se lavan nuevamente con PBS 3 veces, 3 minutos cada lavado y se secan como se mencionó anteriormente.

- Revelado de la placa. Se adicionan 200 µl de conjugado diluido 1:1000 en PBS-SBF 10% por pozo (anticuerpo anti IgG ó IgM humana conjugado con fosfatasa alcalina).

Las placas se incuban nuevamente por una hora a temperatura ambiente. Se lavan con 350  $\mu$ l de PBS por pozo, en 3 ocasiones, 3 minutos cada lavado y se seca. Se adiciona a cada pozo 200  $\mu$ l de sustrato de la enzima disuelto en solución de glicina pH 10.9 a concentración de 1mg/ml. Las placas se incuban a 37°C una hora en la oscuridad. Se leen inmediatamente después en el lector de microELISA a longitud de onda de 405nm. Los valores de los índices de IgG e IgM se calculan: Densidad óptica de la muestra problema/densidad óptica de la pozo de sueros normales.

Los valores de referencia se establecieron estudiando 100 sujetos sanos clínicamente (54). Únicamente 4 de éstos 100 sueros controles dieron como resultado una absorbancia mayor a dos desviaciones estándar por arriba del promedio, tanto para IgG como IgM. Ninguno presentó absorbancia mayor a 5 desviaciones estándar sobre el promedio. El promedio más 2s corresponde a 1.9 unidades arbitrarias (U.A.) para IgG y 2.4 para IgM de aCL; 2.5 para IgG y 0.80 para IgM de aFS y 6.8 para IgG y 2.6 para IgM de aFC.

### **V.A.3. Análisis estadístico.**

Los títulos de aCL, aFS y aFC en los 6 grupos no tuvieron una distribución normal, por lo cual determinamos la mediana de cada uno de estos valores. Debido a que el número de determinaciones de aCL no era similar entre los pacientes con diferentes diagnósticos, se compararon los pacientes con SAFP (SAFP S y SAFP T) entre sí, los pacientes con LEG entre sí (LE APS, LE APT y LE T) y los pacientes con PTI como grupo comparativo con respecto a los otros. Las comparaciones se hicieron con U de Mann Whitney.



## **V.B. Unión de aFL a plaquetas *in vivo*.**

### **V.B.1. Obtención de plaquetas y elución de anticuerpos.**

De todos los pacientes y sujetos sanos incluidos, obtuvimos 20 ml de sangre venosa periférica usando EDTA 7% (1:9) como anticoagulante. El plasma rico en plaquetas se separó mediante centrifugación a 1800 rpm por 10 minutos, las plaquetas se obtuvieron de este plasma por centrifugación subsecuente a 3000 rpm. En todas las ocasiones, se ajustó la cuenta plaquetaria a  $100 \times 10^8$  en 500  $\mu\text{L}$ , a éstas se les agregaron 20  $\mu\text{L}$  de buffer de glicina 3M (pH 3.0) y se incubaron una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron y se separó el sobrenadante del botón plaquetario, a dicho sobrenadante donde se encontraban los anticuerpos eluidos, se le agregaron 5  $\mu\text{L}$  de buffer Tris (pH 10) para neutralizar el pH, posteriormente se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de utilizarse.

### **V.B.2. Determinación de aFL**

Se determinaron aCL tanto en plasma como en el eluido plaquetario a través del método de ELISA como se describe en el punto V.A.2.

Los plasmas se probaron a una dilución 1:50 y se calcularon unidades arbitrarias según se ha descrito anteriormente. Los eluidos se probaron sin diluir y se calcularon las unidades arbitrarias como la relación entre las densidades ópticas del eluido y las densidades ópticas de la poza de sueros normales a una dilución 1:800.

### **V.B.3 Análisis estadístico.**

Se utilizó la prueba de  $\chi^2$ . Las comparaciones de más de dos grupos se hicieron con análisis de varianza de Kruskal Wallis, para las comparaciones entre dos grupos se utilizó U de Mann Whitney y el análisis de correlación con r de Spearman. El nivel de significancia se estableció en 0.05, pero en el caso de comparaciones múltiples se hizo

ajuste de Bonferroni estableciendo un nivel de significancia de 0.016, por tanto los valores entre 0.016 y 0.05 deben considerarse como probablemente significativos.

## **V.C. Unión de aFL a plaquetas *in vitro*.**

### **V.C.1. Reactivos.**

La trombina bovina fue obtenida de Sigma Chemical Co., ST Louis MO. La preparación empleada contenía una actividad específica de 1U/ml. El anticuerpo monoclonal anti-GMP140 (anti-CD62) (72), fue un obsequio del Dr. Rodger McEver, Universidad de Oklahoma. En toda ocasión fue utilizado a una concentración de 1mg/ml. El anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fluoresceína (FITC) y el anticuerpo de cabra anti-IgG murina conjugado con ficoeritrina (PE) fueron adquiridos de Sigma y se emplearon de acuerdo a las recomendaciones de esta compañía. El suero policlonal de conejo anti- $\beta$ 2 glicoproteína I humana fue un obsequio de Behring, Weke, Marburg.

### **V.C.2. Plasma**

De 7 pacientes con diagnóstico de SAFP se obtuvieron 40ml de sangre periférica con EDTA 7% (1:9) como anticoagulante.

Todas las pacientes cursaban con títulos altos de aCL IgG/IgM ó IgG al momento del estudio y una de ellas cursaba además con títulos altos de aFS.

### **V.C.3. Purificación de aFL.**

Los aCL y aFS se purificaron por cromatografía de afinidad (73). Para la obtención de aCL se empleó como matriz acrilamida-bis acrilamida (15%-5%) sobre la cual se inmovilizaron CL, colesterol y dicetilfosfato. Para la obtención de aFS, a la matriz de acrilamida-bis acrilamida se le agregaron colesterol y fosfatidilserina. Las matrices así formadas se polimerizaron en presencia de persulfato de amonio y TEMED, luego de

lo cual se homogeneizaron y se colocaron en columnas de 1.5 X 10 cm. Todos los plasmas se corrieron en forma individual por la columna de CL y FS, según el caso. Tanto los aCL como los aFS fueron eluidos mediante solución amortiguadora de fosfatos hiperbolar (0.6M), seguida de solución de glicina-HCl (0.1M) pH 3.0. La cromatografía fue monitorizada mediante un detector UV (280 nm).

Los anticuerpos así obtenidos se dializaron, concentraron (100 µg/ml) y se mantuvieron a 4°C en presencia de NaN<sub>3</sub> 0.02% hasta ser empleados .

La pureza de los anticuerpos se demostró mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) en condiciones de reducción. Se realizó transferencia de geles no reducidos a papel de nitrocelulosa, uno de ellos se tiñó con amido-black y en los otros se realizó inmunoelectrotransferencia para evaluar la especificidad de las proteínas identificadas en el gel. Se utilizó anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina en un caso y anti-β2 glicoproteína I y anti-inmunoglobulinas de conejo marcadas con fosfatasa alcalina (Figura 4).

En todos los anticuerpos purificados se corroboró su reactividad aFL por la técnica estándar de ELISA mencionada en el punto V.A.2.

#### **V.C.4. Separación y activación de plaquetas.**

Se obtuvo sangre periférica de sujetos normales con EDTA 7% (1:9) como anticoagulante. Las plaquetas se obtuvieron según el método descrito en el punto V.B.1, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-EDTA 1mM y fueron ajustadas a 500 X 10<sup>6</sup>/500 µl de solución de lavado.

La activación de plaquetas se llevó a cabo mediante incubación con 10 µl de trombina durante 30 minutos a 37°C (74). Posteriormente, se fijaron en 1 ml de solución de formaldehído al 3%. Las plaquetas que fueron consideradas en reposo se fijaron en formaldehído inmediatamente después de haber sido lavadas con PBS-EDTA.

#### **V.C.5. Análisis citofluorométrico.**

Se incubaron  $50 \times 10^6$  plaquetas con 0.1 ml de cada uno de los aFL purificados. Posteriormente se incubaron con 0.02 ml de anticuerpo de cabra anti-IgG humana-FITC. Seguido a ésto, las plaquetas se incubaron con 0.02 ml de anti-GMP140. Finalmente, fueron incubadas con 0.02 ml de anticuerpo de cabra anti-IgG murina-PE. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 4°C por 50 minutos seguidas de 3 lavados con PBS-EDTA.

Los anticuerpos conjugados con fluorocromos fueron empleados sin incubación previa como control de fluorescencia inespecífica. Las plaquetas teñidas fueron analizadas en un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View CA) con amplificación logarítmica. En toda ocasión se analizaron 10,000 plaquetas para cada variable experimental.

#### **V.C.6. Análisis estadístico.**

Se usaron medianas como medida de tendencia central. En cada experimento se analizaron las variables de plaquetas en reposo vs activadas a través de prueba de Wilcoxon. Las comparaciones para grupos independientes se hicieron con U de Mann Whitney.

### **VI. RESULTADOS.**

#### **VI.A. Determinación de aFL en suero.**

Se revisaron 212 expedientes de pacientes con diagnóstico de LEG para formar los grupos, de éstos solo 110 se incluyeron. Las causas por las que no se incluyeron los 102 restantes fueron: 35 no reunieron criterios clínicos de síndrome antifosfolípido, 40 no reunieron criterios serológicos de síndrome antifosfolípido, 10 no tuvieron

seguimiento y evolución mínimos requeridos, en 13 hubo dudas respecto a la causa de trombocitopenia y 4 tuvieron diagnóstico de Síndrome de Fisher-Evans.

Las características generales de los 110 pacientes incluidos se encuentran en el cuadro 3. Los pacientes con SAFP S y SAFP T tenían en promedio  $5.55 \pm 3.9$  determinaciones de aCL G y M por paciente, los grupos de LEG (LE APS, LE APT y LE T) tenían  $6.04 \pm 2.8$  determinaciones por paciente y los del grupo de PTI tenían solamente una ó dos determinaciones.

Las medianas e intervalos de los títulos de aCL, aFS y aFS isotipos IgG e IgM de los 6 grupos se muestran en los cuadros 4, 5 y 6.

Los títulos mas altos se encontraron en los pacientes con SAFP, sin embargo no hubo diferencia entre ellos, al dividirlos de acuerdo a aquellos que habían cursado con trombocitopenia y los que no.

Entre los pacientes con LEG, aquellos del grupo LE T tuvieron los títulos más bajos de aCL, ya que fueron los pacientes con LEG que por definición no tenían síndrome antifosfolípido asociado (cuadro 4).

Al comparar los grupos III y IV, que tenían LEG y síndrome antifosfolípido asociado y cuya única diferencia era la presencia de trombocitopenia en el segundo grupo, los pacientes del grupo LE APS tienen títulos mayores de aCL IgM ( $p=0.04$ ) (cuadro 4) y títulos menores de aFS IgG ( $p=0.049$ ) (cuadro 6) con respecto a los del grupo IV. No hubo diferencia en los títulos de aFC y aFS isotipo IgM entre los grupos, incluso el grupo LE T, todos estos se encontraron dentro de los valores de referencia de los sujetos sanos (cuadros 5 y 6).

Los pacientes con PTI tuvieron títulos de aCL, aFS y aFC menores a los pacientes con SAFP y LEG con síndrome antifosfolípido asociado y similares a aquellos de los pacientes con LE T (cuadros 5 y 6).

## VI.B. Unión de aFL a plaquetas *in vivo*.

### VI.B.1. Frecuencia de aFL unidos a plaquetas.

En este estudio, 18% de los pacientes que se incluyeron tenían aFL IgG unida a plaquetas y un porcentaje similar tuvieron IgM (cuadro 7). Once pacientes tuvieron aFL de ambos isotipos (9 con TCP y 2 con antecedente de TCP). Se encontró con mas frecuencia aFL unida a plaquetas en pacientes con TCP que en aquellos con antecedente de TCP y que aquellos sin TCP. Las diferencias fueron significativas para ambos isotipos. Los pacientes con LEG y SAFF con TCP y antecedente de TCP tuvieron aFL unido a plaquetas con mayor frecuencia que aquellos sin TCP (IgG 36.6% vs 5.3% e IgM 40.9% vs 0). Los pacientes con PTI, con TCP ó antecedente de la misma tuvieron con la misma frecuencia aFL unido a plaquetas que los pacientes con LEG y SAFF, a pesar de que unicamente 6 de los 19 pacientes con PTI cursaban con títulos altos de aFL en suero, a diferencia de los pacientes con LEG y SAFF, todos los cuales tuvieron aFL en suero.

### VI. B.2. Títulos de aFL unidos a plaquetas.

Los anticuerpos eluidos de los pacientes con TCP y antecedente de TCP tuvieron títulos significativamente más altos de aFL que aquellos de pacientes con cuentas plaquetarias persistentemente normales (figura 1).

Los títulos de aFL eluidos de plaquetas de cada uno de los pacientes y los controles se muestran en la figura 2.

Los pacientes con LEG y con TCP y los pacientes con PTI con y antecedente de TCP tuvieron los títulos más altos de aFL IgG en el eluido plaquetario al compararlos con los controles sanos ( $p=0.005$ ,  $p=0.007$ ,  $p=0.006$  respectivamente) (figura 2a). Los títulos mas altos de aFL IgM en eluidos de plaquetas de pacientes con LEG ó PTI con TCP ó antecedente de TCP (figura 2b) no alcanzó significancia estadística al hacer las comparaciones. No hubo correlación entre la presencia ó títulos de aCL de ambos

isotipos en el eluido plaquetario y de factor reumatoide en el suero correspondiente (datos no mostrados).

Estudiamos 7 pacientes al momento de TCP activa y cuando sus cuentas plaquetarias se normalizaron. En cinco de ellos ambos isotipos de aFL unidos a plaquetas disminuyeron al corregirse la cuenta plaquetaria (figura 3).

### **VI.B.3. Correlación entre aFL unidos a plaquetas y TCP.**

Encontramos una correlación inversa significativa entre la cantidad de IgM unido a plaquetas y el número de plaquetas en los pacientes con LEG y trombocitopenia al momento de la toma ( $r = -0.68$ ,  $p < 0.01$ ).

## **VI.C. Unión de aFL a plaquetas *in vitro*.**

### **VI.C.1 Cromatografía de afinidad de aFL.**

Purificamos aCL y aFS por cromatografía de afinidad del plasma de 7 pacientes con títulos altos de IgG/IgM ó IgG aCL ó aFS. Todos los anticuerpos obtenidos por este proceso fueron analizados tanto en su reactividad aFL, como en su isotipo por el método de ELISA. Los 7 anticuerpos purificados fueron todos del isotipo IgG y presentaron alta reactividad con el antígeno. No obstante esto, el método resultó ser de bajo rendimiento, ya que el plasma eluido en el primer paso de la cromatografía i.e. el no retenido, no presentó disminución significativa en su reactividad aFL. El rendimiento de anticuerpos específicos para aCL y para aFS se encontró entre 100-150ug por cada 20 ml de todos los plasmas estudiados (cuadro 8).

### **VI.C.2 Electroforesis de aFL purificados.**

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida demostró un alto grado de pureza de los anticuerpos aislados, con una pequeña contaminación de una proteína de aproximadamente 50 kD, misma que pudo ser removida parcialmente con solución saturada de sulfato de amonio al 50% previa a la cromatografía de afinidad, por inmunoelectrotransferencia se corroboró que dicha proteína corresponde a  $\beta 2$  glicoproteína I. La remoción de ésta, no afectó la reactividad de aFL de los anticuerpos eluidos y retenidos. El peso molecular de la proteína (150kD) corrobora el isotipo IgG del anticuerpo (figura 4).

### **VI.C.3 Unión de aFL purificados a plaquetas.**

Se realizaron en total 10 experimentos para determinar la unión de aCL a plaquetas, tanto en reposo como estimuladas con trombina y 7 experimentos con el aFS en las mismas condiciones.

Los aCL purificados de los 7 pacientes se comportaron en forma similar en todos los ensayos. Como grupo, éstos se unen en menor proporción a plaquetas al compararlos con los aFS (figura 5). En los análisis de citofluorografía la unión de aFL a plaquetas fue discretamente mayor a aquellas plaquetas estimuladas con trombina en comparación con las no estimuladas, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa, por otra parte, los anticuerpos anti-GMP140 se unieron en una mayor proporción a las plaquetas estimuladas con trombina al compararias con las no estimuladas ( $p=0.004$ ) (figura 6, cuadro 9).

En estudios de doble marcaje encontramos que los aFL, especialmente aFS se unieron selectivamente a plaquetas que expresan GMP140 al ser activadas con trombina, dando una mayor proporción de dobles positivas en éstas al compararias con las no estimuladas ( $p=0.0005$ ) (figura 6, cuadro 9).

En algunos experimentos se agregaron aFS FITC e IgG humana FITC sin actividad de aFL, para evaluar la unión de los anticuerpos a través de receptores Fc en las plaquetas; en todos los casos, la unión de aFL a plaquetas en reposo y activadas fue



4 veces mayor que la unión de IgG irrelevante. La unión tanto de aFS como de IgG fue mayor a plaquetas activadas que a plaquetas en reposo (datos no mostrados).

## VII. DISCUSION.

En este estudio encontramos que los pacientes con LE APT tuvieron títulos más altos de aFS IgG, esto apoyaría la noción que los aFS son los anticuerpos más frecuentemente asociados a TCP por ser FS un fosfolípido de membrana plaquetaria, a diferencia de CL (49), llama la atención que en ese mismo grupo de pacientes no hayamos encontrado títulos mayores de aCL IgG, los cuales serían anticuerpos de reacción cruzada y por tanto, es posible que en aquellos pacientes con LEG, manifestaciones clínicas asociadas a aFL y TCP con títulos normales de aCL sería recomendable buscar aFS de isotipo IgG; éstos serían algunos de los pacientes que no incluimos en el estudio por no reunir criterios serológicos. El grupo de pacientes con LEG y TCP pero sin síndrome antifosfolípido tuvo títulos de aFL similares a aquellos de los sujetos sanos y los pacientes con PTI, esto apoyaría el hecho de que los aFL no son únicamente epifenómenos del daño plaquetario y es posible que en éstos pacientes se encuentren anticuerpos contra otros antígenos plaquetarios (58-61). Encontramos más frecuentemente aCL IgM en el subgrupo de LE APS comparados con LE APT, los primeros tienen síndrome antifosfolípido asociado pero nunca han cursado con TCP, a diferencia de los segundos, lo cual hace que en el primer grupo haya un número importante de pacientes con LEG y anemia hemolítica, los cuales ya se ha descrito anteriormente (28,29) cursan frecuentemente con aCL IgM.

Los títulos de aFL, isotipo y especificidad de los mismos fueron semejantes en los pacientes con SAFP con y sin TCP, particularmente para aFS el valor que corresponde a la mediana es incluso mayor en los pacientes con SAFP sin TCP tanto para el isotipo IgG como IgM, sin embargo, la dispersión de los datos es muy amplia y el número de

pacientes muy pequeño para darnos como resultado diferencias significativas y sería necesario buscar lo anterior en un grupo mayor de pacientes, así como en estudios futuros buscar la presencia de otros anticuerpos anti-plaquetas en estos pacientes. Es probable que a pesar de los títulos de los aFL, la especificidad de los mismos y el isotipo, la sola presencia de los aFL no determine que un paciente tenga TCP y que haya otros factores que podrían estar involucrados (52-54).

En la segunda parte encontramos que aunque los aFL unidos a plaquetas se encontraron en todos los grupos de pacientes, su frecuencia y títulos fueron mas altos en pacientes con TCP activa que en aquellos con antecedente de la misma y que en estos últimos eran mayores que en pacientes sin TCP estas diferencias fueron mas aparentes con el isotipo IgG que con el isotipo IgM, lo cual va de acuerdo a observaciones previas en que se ha reportado una asociación más importante de TCP con aCL IgG que IgM (11).

Los títulos de aFL en los eluidos plaquetarios de los paciente con LEG y SAFP sin TCP fueron tan bajos como los encontrados en sujetos sanos, a pesar de que estos pacientes tenían aFL en suero que no tenían los controles.

La ausencia de TCP en presencia de aFL unido a plaquetas que se observó en algunos pacientes con SAFP puede depender de las mismas plaquetas, ó de diferencias del antígeno: se ha descrito que los aFL tienen diferente reactividad cuando varía la estructura laminar de los FLs (75,76) y cuando varía el tipo y la longitud de las cadenas de ácidos grasos (77), ó de diferencias cualitativas y menos probablemente cuantitativas de los anticuerpos, ó tal vez de otros factores.

Es probable que la membrana de las plaquetas haya sufrido un cambio en la asimetría por cualquiera de éstas razones que la hacen suceptible para la unión de los aFL, independientemente de la enfermedad de base. En favor de esta posibilidad se encuentra la observación de pacientes con SAFP y TCP refractaria al tratamiento con esteroides que respondieron a dosis bajas de aspirina (78).

Out y colaboradores (71) no encontraron mayor activación plaquetaria, a través de citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal en 7 pacientes con TCP leve y aFL en suero, algunos de los cuales tenían aFL unidos a plaquetas.

El encontrar con mayor frecuencia y a títulos más altos aFL unidos a plaquetas en pacientes con antecedente de TCP a pesar de cuentas plaquetarias normales puede significar que: 1. El anticuerpo no tenga ningún papel en la patogenia de la TCP. 2. La cantidad de anticuerpos unidos a las plaquetas, que fue menor que en aquellos pacientes con TCP, no sea suficiente para causar TCP. 3. Que su unión a plaquetas ocurra bajo circunstancias en las cuales las plaquetas, a pesar de tener el anticuerpo unido ésto no determine su destrucción y 4. Que otros factores tales como deficiencias adquiridas de anticoagulantes naturales (79), la necesidad de  $\beta 2$  glicoproteína I, al menos *in vitro*, para la unión de algunos, aunque no todos los aFL IgG, a fosfolípidos de carga negativa (80-83), ó la reactividad potencial de los aFL que tienen actividad de anticoagulante lúpico con el complejo de protrombina-fosfolípidos (84,85).

En este estudio encontramos dos probables indicadores del papel de los aFL en TCP. El primero es la presencia de aFL unidos a plaquetas en pacientes con TCP > antecedente de TCP > sin TCP y el segundo, la correlación entre la cantidad de aFL IgM eluido de plaquetas y grado de TCP en pacientes con LEG y TCP. Hay también datos que indican que los aFL se han unido a las plaquetas a través de un mecanismo activo y no pasivo, estos datos son la falta de correlación entre la cantidad de aFL en el plasma y aFL unidos a plaquetas y que el anticuerpo se eluyó a pH ácido en un período de tiempo relativamente corto.

Por último, en la tercera parte del protocolo encontramos al hacer el análisis con un solo fluorocromo, que los aFL se unen a plaquetas en reposo tanto como a plaquetas activadas y en ambas la unión de los aFL por Fc (86,87) unicamente explica menos del 25% de la fluorescencia positiva. Bajo el estímulo con trombina, los aFL se unieron preferentemente a aquellas plaquetas que expresaban GMP140. La unión de aFS a las plaquetas fue mayor que la de los aCL. Durante la activación plaquetaria, la translocación de FS a la superficie de la membrana parece estar relacionada

temporalmente con el proceso de secreción de sustancias, como GMP140, de los gránulos alfa (88,89). Este es un proceso dinámico que rápidamente es revertido por la translocasa de aminofosfolípidos, sin embargo, esta enzima podría estar inactiva y dar lugar a expresión prolongada de FS en la superficie de las plaquetas en forma simultánea a GMP140, lo cual podría explicar la coexpresión de ambas moléculas en una subpoblación de plaquetas estimuladas con trombina (50,51).

Aunque aparentemente, los diferentes estudios han reportado la capacidad de los aFL de unirse a plaquetas existe controversia respecto al estado en el cual deben encontrarse éstas para favorecer la unión del anticuerpo (64-71). Estudios anteriores han usado sueros positivos para aCL (64-66), y anticuerpos monoclonales con actividad de aCL (67-69). Se han descrito algunos anticuerpos monoclonales humano-murinos con actividad de anticoagulante lúpico que se une a plaquetas vivas y fijadas con paraformaldehído (90).

En un estudio previo, con un anticuerpo monoclonal aFS se demostró que éste tenía actividad anti-plaquetas y anti-células endoteliales, que reaccionaba pobremente con plaquetas en reposo y de manera mas significativa con plaquetas activadas con trombina (67).

En este estudio, purificamos los aFL de 7 pacientes con SAPP, uno de los cuales también tenía actividad aFS. Todos los anticuerpos purificados fueron de isotipo IgG y tomando en cuenta las condiciones de la purificación, podemos pensar que se trata de anticuerpos de alta afinidad por el antígeno. Anteriormente ya se habían obtenido aFL por cromatografía de afinidad, sin embargo éstos se utilizaron para establecer las diferencias entre la reactividad aCL y la actividad de anticoagulante lúpico (24). La observación que los aFS se unieron mas que los aCL a plaquetas puede explicarse por la presencia de FS y no CL en la membrana plaquetaria.

Actualmente hay un reporte en la literatura que muestra unión de un anticuerpo monoclonal aFS a plaquetas, lo cual no se observó con otro anticuerpo monoclonal aCL (70).

Es probable que además de lo anterior, en el proceso de unión de los aFL a plaquetas, participen otros elementos que podrían explicar la similitud encontrada en la unión de

aFL a plaquetas en reposo y activadas con trombina en los estudios con un solo fluorocromo. Uno de estos factores podría ser la  $\beta_2$  glicoproteína I, la cual se ha identificado como cofactor en la interacción de aFL-fosfolípidos aniónicos y la cual, al menos *in vitro* se une a plaquetas (83). Hasta donde sabemos, este estudio muestra por primera vez la unión de aFL policlonales humanos purificados a plaquetas en un estado preciso de activación.

Sin duda alguna, el papel de los aFL en la trombocitopenia que se observa en los pacientes con SAFR, LEG y PTI tiene todavía muchos aspectos que no han sido descritos. Muy probablemente el papel de los aFL no tenga la misma relevancia en las tres enfermedades y es posible que la alteración que favorece la unión de dichos anticuerpos y tal vez otros anticuerpos a las plaquetas esté dada por un mecanismo común en estos tres tipos de trombocitopenia autoinmune y más aún que la unión de los aFL a las plaquetas no es el único evento que determina posteriormente su destrucción.

**Cuadro 1.**  
**Manifestaciones clínicas asociadas a aFL.**

- 
- Trombosis venosas de repetición.
  - Oclusiones arteriales
  - Pérdida fetal recurrente
  - Trombocitopenia
  - Úlceras en piernas
  - Livedo reticularis
  - Hipertensión pulmonar
  - Mielitís transversa
  - Anemia hemolítica
-

**Cuadro 2.**  
**aFL en enfermedades no autoinmunes.**

---

I. Infecciosas.	Bacterianas	Gram + y gram - Sífilis Lyme Tuberculosis y lepra
	Virales	S.I.D.A. Mononucleosis infecciosa
II. Neoplasias	Leucemias Linfomas Disproteinemias	
III. Medicamentos	Clorpromazina	
IV. Otras.	Inmunodeficiencias primarias Infarto agudo al miocardio Accidente vascular cerebral Pérdida fetal recurrente	
V. Sanos	Embarazo > 65 años	

---

Cuadro 3.  
 Datos generales de los pacientes estudiados.

	n	Sexo M/F	Edad x+s	Núm.determina- ciones x±s <sup>^</sup>
SAFP S	11	0/11	29.2 ±7.3	5.55 ±3.9*
SAFP T	9	1/8	34.2 ±9.8	
LE APS	23	1/22	34.6 ±8.4	
LE APT	23	3/9	30.3 ±10.2	6.04 ±2.8**
LE T	13	2/11	38.3 ±6.4	
PTI	31	8/23	35.2 ±12.2	1-2

<sup>^</sup> Determinaciones de aCL y cuenta plaquetaria.

\* En los dos grupos de SAFP.

\*\* En los tres grupos de LEG.



**Cuadro 4.**  
**Títulos de aCL (medianas)**

	IgG (intervalo)	p	IgM (intervalo)	p
SAFP S	16,5 (3.8-33.7)		4,7 (1.0-50.0)	
SAFP T	8,4 (1.3-24.3)		5,5 (2.2- 15.4)	
LE APS*	4,1 (0,7- 15,6)		4,6 (0,8- 13,8)	
LE APT	7,1 (0,3-20,9)		2,4 (0,6- 10,6)	0,041
LE T	0,9 (0,4-2,0)	0,00004	1,0 (0,3-4,0)	0,023
PTI	0,9 (0,08-2,3)		0,5 (0-5,1)	

\* IgG vs LE T p=0.00001, IgM vs LE T p=0.0005

**Cuadro 5.**  
**Títulos de aFC (medianas)\***

	IgG (intervalo)	IgM (intervalo)
SAFP S	1.4 (0.5-3.2)	3.9 (1.1-10.9)
SAFP T	1.95 (0.5-7.9)	4.3 (2.8-24.3)
LE APS	0.89 (0-11.3)	1.52 (0.3-9.7)
LE APT	1.0 (0-4.5)	1.05 (0.26-7.12)
LE T	0.37 (0-3.97)	1.4 (0.15-11.32)
PTI	1.2 (0-4.72)	0.16 (0-5.57)

\* las diferencias no fueron significativas.

**Cuadro 6.**  
**Títulos de aFS (medianas)**

	IgG (intervalo)	IgM (intervalo)
SAFP S	1.2 (0.3-10)	2.0 (0.2-34.7)
SAFP T	0.6 (0.4-18.7)	1.85 (0.7-6.1)
LE APS	0.48* (0-3.5)	1.88 (0-7.88)
LE APT	0.75 (0-6.65)	0.88 (0-5.33)
LE T	0.26 (0-6.65)	0.77 (0-10.3)
PTI	0.35 (0-5.0)	0.5 (0-6.0)

\* vs LE APT p=0.049

**Cuadro 7.**  
**Número de pacientes con IgG/IgM unido a plaquetas.**

Pacientes	Número de pacientes positivos (%)*			
	n	IgG aCL	IgM aCL	Ambas
Con TCP (todos)	29	10 (34.5)	11 (37.9)	9
LEG	15	6	7	6
SAFP	6	1	1	1
PTI	8	3	3	2
Ant.TCP (todos)	37	4 (10.8)	3 ( 8.1)	2
LEG	14	1	1	0
SAFP	8	0	0	0
PTI	15	3	2	2
Sin TCP (todos)	19	1 ( 5.3)	0	0
LEG	10	0	0	0
SAFP	9	1	0	0
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>15 (17.6)</b>	<b>14 (16.4)</b>	<b>11(12.9)</b>

\* por arriba de la percentila 97 de los controles sanos.

Significancia:

Con TCP vs Ant. TCP: IgG  $p < 0.05$ ; IgM  $p < 0.01$ .

Con TCP vs Sin TCP : IgG  $p < 0.05$ ; IgM  $p < 0.025$ .

Con TCP + Ant TCP vs sin TCP: IgG e IgM NS.

Los pacientes estudiados en dos ocasiones se incluyeron en los grupos

Con TCP y Ant. TCP respectivamente.

**Cuadro 8.**  
**Reactividad de aFL purificados\***

Cromatografía de afinidad			
Plasma	Basal	No retenido	Retenido
1	1.76	0.508	0.374
2	>2.00	0.740	0.208
3	>2.00	0.920	0.308
4	>2.00	1.868	0.325
5	1.52	1.415	0.270
6	0.99	0.585	0.178
7	1.38	1.34	0.153

\* Los valores representan densidades ópticas a 405 nm, por ELISA, todas las muestras se probaron sin diluir.

Cuadro 9.  
Unión de aFL y anti-GMP140 a plaquetas. \*

	aFL (%)**	anti-GMP 140 (%)	aFL/anti-GMP140 (%)
Sin trombina	19.33	5.39	3.11
Con trombina	19.68	42.93	6.42
p	NS	0.004	0.0005

\* Los valores representan la mediana de 17 experimentos.

\*\* Porcentaje de fluorescencia.

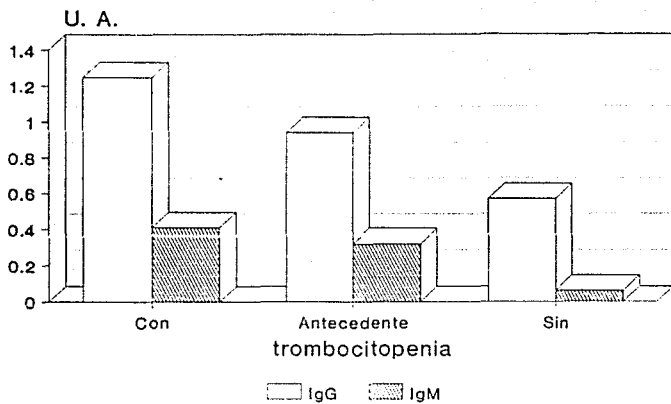
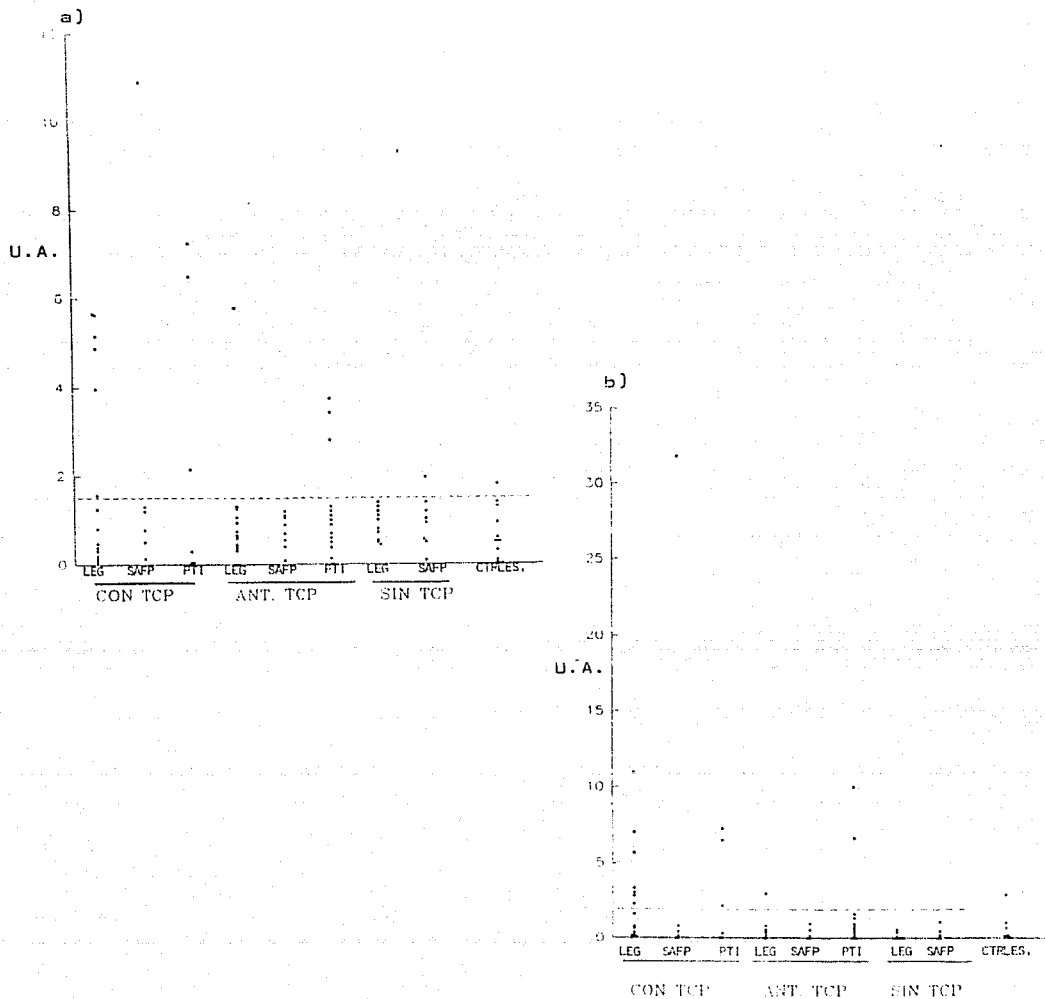


Figura 1.

Diferencias en títulos de aFL en eluido de plaquetas (medianas) en los pacientes estudiados de acuerdo a los grupos de trombocitopenia: Con, Antecedente, Sin; independientemente de su enfermedad. Kruskal Wallis: IgG  $p=0.08$ , IgM  $p=0.0015$ . Con TCP vs Sin TCP: IgG  $p=0.03$ , IgM  $p=0.0008$ ; Ant TCP vs Sin TCP: IgM  $p=0.009$ . El resto de las comparaciones no son significativas. U.A.: unidades arbitrarias.

Figura 2. Distribución de los títulos de aFL unidos a plaquetas de acuerdo a los grupos de TCP y enfermedad de base. a) IgG aFL, b) IgM aFL. La línea paralela a la abscisa representa la percentila 97 de los sujetos sanos. U.A.: unidades arbitrarias.





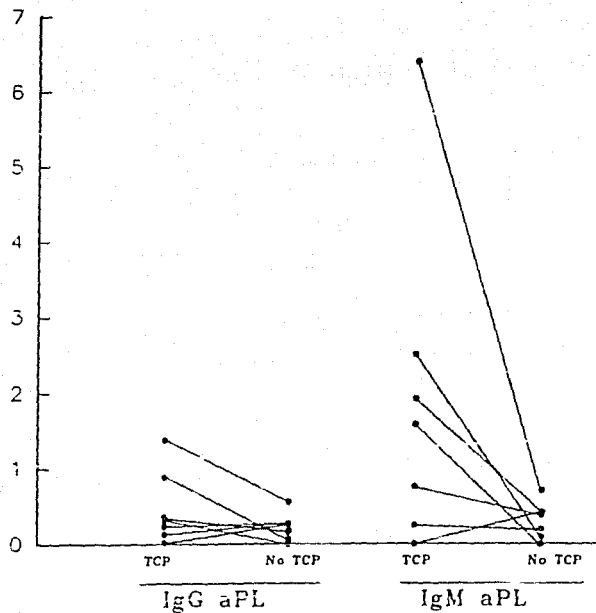


Figura 3.

Cambios en aPL unidos a plaquetas en 7 pacientes estudiados al momento que cursaban con trombocitopenia y cuando se corrigió la cifra de plaquetas. U.A.: unidades arbitrarias.

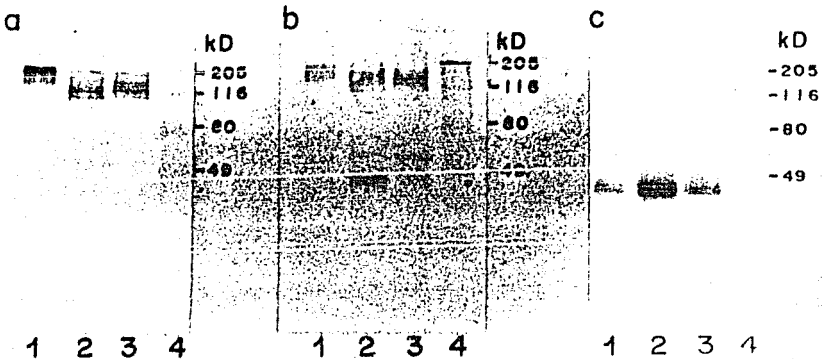


Figura 4.

B: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS no reducido, transferido a papel de nitrocelulosa y teñido con amido-black. El primer carril representa aFS, el segundo y el tercero aCL, el cuarto carril corresponde a los pesos moleculares estándar en A, B y C.

A: Inmuno-electrotransferencia de los anticuerpos aFS y aCL al agregarles anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina.

C: Inmuno-electrotransferencia de los anticuerpos aFS y aCL al agregarles anti-β2 glicoproteína I humana.

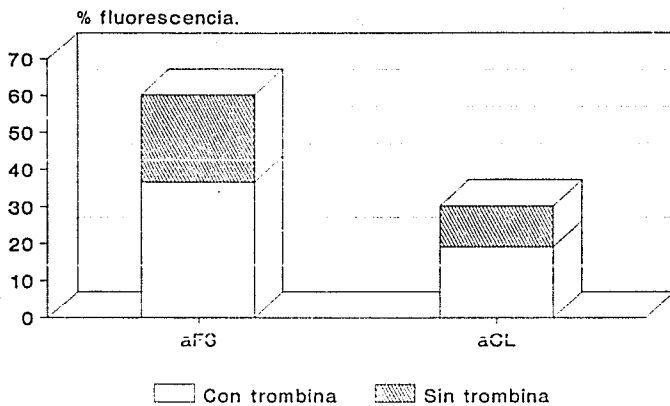


Figura 5.

Comparación entre los anticuerpos aFS y aCL con respecto a su capacidad de unión a plaquetas. La figura representa el porcentaje de fluorescencia usando el anticuerpo de cabra anti-IgG humana fluoresceinada. Al comparar la unión de aFS vs aCL sin trombina  $p=0.067$  y la unión de aFS vs aCL con trombina  $p=0.002$ .

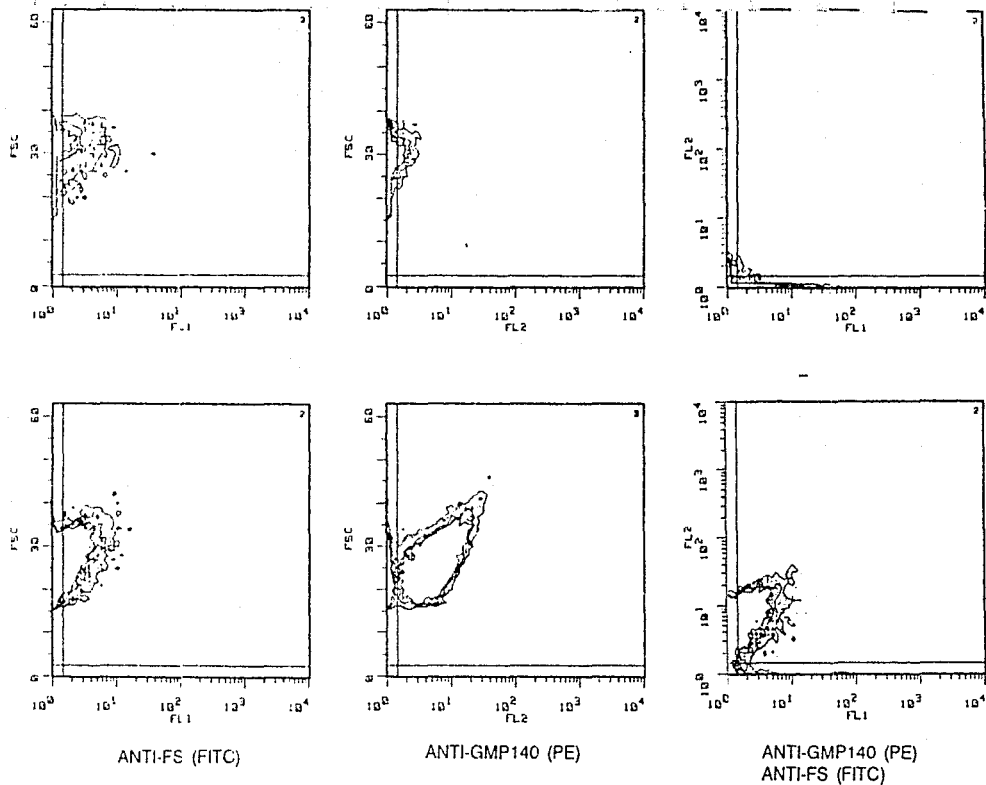


Figura 6.

Citofluorografía representativa de plaquetas no activadas y activadas: A: Citogramas de plaquetas en reposo B: Citogramas de plaquetas estimuladas con trombina.

Los dos citogramas de la izquierda muestran unión de aFS, los citogramas centrales muestran la unión del anticuerpo anti-GMP140. El eje de X en éstos cuatro citogramas representa porcentaje de fluorescencia y el eje de Y tamaño de plaquetas.

Los citogramas de la derecha muestran el análisis de doble marcaje. El eje de X muestra unión de aFS y el eje de Y unión de anti-GMP140.

## ANEXO 1.

### DEFINICIONES OPERACIONALES.

\* **Lupus eritematoso generalizado.** De acuerdo a los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR), antes Asociación Americana de Reumatología (ARA), 1982. (91)

\* **Síndrome antitrombolipídico primario.** De acuerdo a los criterios propuestos por Alarcón-Segovia, Sánchez-Guerrero (12).

\* **Trombocitopenia.** Menos de 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> en al menos dos determinaciones subsecuentes, realizadas en esta institución y que se haya considerado por parte del médico tratante como secundaria a actividad de la enfermedad, en ausencia de otros factores de riesgo.

\* **Síndrome antitrombolipídico secundario ó asociado.** Aquellos pacientes con diagnóstico de LEG, más de dos manifestaciones clínicas asociadas a síndrome antitrombolipídico y títulos de aCL por arriba de cinco desviaciones estándar por arriba de la media de los sujetos sanos, en al menos una ocasión (18).

\* **Púrpura trombocitopenica idiopática.** Según los criterios de Karpatkin (1985) (92).

\* **Sanos.** Individuos de 20 a 50 años de edad, sin enfermedad subyacente conocida (por interrogatorio) que no tengan antecedente de embarazo ni transfusiones, que no hayan ingerido ácido acetilsalicílico ni otros antiinflamatorios no esteroideos diez días antes de la toma de la muestra y que tengan cuenta plaquetaria y aCL dentro de los valores de referencia considerados como normales.

## REFERENCIAS.

1. Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ. Peripheral vascular syndromes associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Int Med* 1965;62:907-19.
2. Harris EN, Gharavi A, Hughes G: Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985; 11:591-609.
3. Hughes GRV: The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1985; 3:285-6.
4. Asherson R: Anticardiolipin antibodies: Clinical associations. *Postgrad Med J* 1986; 62:1081-7.
5. Hughes G, Harris EN, Gharavi A: The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986;13:486-9.
6. Font J, Cervera R, López-Soto A, Pallares L et al. Anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases: isotype distribution and clinical associations. *Clin Rheumatol* 1989;8:475
7. Bingley PG, Hoffbran BI: Antiphospholipid antibody syndrome. *J Rheumatol* 1987; 80:445-8.
8. Harris EN. Crossreactivity of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985; 16:1-6.
9. Weidmann C, Wallace D, Peter J et al: Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody isotypes in SLE. *J Rheumatol* 1988; 15:74-9
10. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV: Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46:1-6.
11. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine* 1989; 68:353-65.
12. Alarcón-Segovia D, Sánchez Guerrero J: Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16:482-5.
13. Asherson R: A "Primary" antiphospholipid syndrome? *J Rheumatol* 1986; 15:12-13.
14. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RHWM et al: The "Primary" antiphospholipid syndrome: Major clinical and serological features. *Medicine* 1989; 68:366-74.
15. Delezé M, Alarcón Segovia D: Ocurrence of both hemolytic anemia and thrombocytopenic purpura (Evans syndrome) in Systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1989; 16:926-30.
16. Alarcón Segovia D: Pathogenic potential of antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1988; 15:890-3.
17. Alarcón-Segovia D: The pathophysiology of antiphospholipid antibodies. *Sem Clin Immunol* 1991; 1:11-9.
18. Alarcón-Segovia D, Pérez Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C et al. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 21:275-86.

19. MackWorth Young C. Antiphospholipid antibodies: More than just a disease marker? *Immunol Today* 1990; 11:60-65.
20. Pedersen NS, Orum O, Mouritsen S. Enzyme linked immunoabsorbent assay for detection of antibodies to the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) antigen in syphilis. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1711-6.
21. Thiagarajan P, Shapiro SS, De Marco L. Monoclonal immunoglobulin M-lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity. Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980;66:397
22. Gastneau DA, Kazmier FJ, Nichols WL, Bowie EWJ. Lupus anticoagulant: ana analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases. *Am J Hematol* 1985;19:265
23. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanisms of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood* 1987; 70:69-76.
24. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br J Hematol* 1989; 73:506.
25. Triplett DA, Brandt J. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. *Br J Hematol* 1989; 73:139-42.
26. Loizou SI, McCrea JD, Rudge AC et al: Measurement of anticardiolipin antibodies by enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) standarization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 52:738-45.
27. Harris EN. The Second International Anti-cardiolipin Standarization Workshop/The Kingston anti-phospholipid antibody study (KAPS) group. *Am J Clin Pathol* 1990; 94:476-84.
28. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D: Hemolytic anemia related to an IgM autoantibody to phosphatidilcholine that binds in vitro to stored and to bromelain treated human erythrocytes. *J Autoimmunity* 1990; 3:773-87.
29. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Hemolytic anemia in systemic lupus erythematosus associates strongly with IgM anti-phosphatidylcholine antibodies. (resumen) *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8:212
30. Shoefeld Y, Rauch J, Massicotte H, Datta SK et al. Polyspecificity of monoclonal lupus antibodies produced by human-human hybridomas. *New Engl J Med* 1983;308:414
31. Hayakawa KI, Hardy R, Honda M, Herzenberg LA et al. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:2494
32. Misra R, Venables PJW, Watkins RPF, Maini RN. Autoimmunity to cardiolipin in infectious mononucleosis. *Lancet* 1987;2:629.
33. Colaco CB, Mackie IJ, Irving W, Machin SJ. Anticardiolipin antibodies in viral infection. *Lancet* 1989;1:622.
34. Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD, Hughes GRV. Use of an enzyme linked immunoabsorbent assay and of inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis and autoimmune disorders. *J Infect Dis* 1988; 157:23-31.

35. Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano L, Habina L et al. Characteristics of IgG antiphospholipid antibodies in patients with Systemic lupus erythematosus and Syphilis. *J Rheumatol* 1990; 17: 1036-41
36. Loizou S, Mackwoth-Young CG, Cofiner C, Walport MJ. Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipids of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus and with syphilis. *Clin Exp Immunol* 1990;80:171
37. Costello PB, Green FA. Reactivity patterns of human anticardiolipin and the antiphospholipid antibodies in syphilitic sera. *Infect Immun* 1986;51:771-5.
38. Costello PB, Green FA. Binding affinity of serum IgG to cardiolipin and other phospholipids in patients with systemic Lupus Erythematosus and Syphilis. *Infect Immun* 1988; 56:1738-42.
39. Costello PS, Powell GL, Green FA. The structural requirements for anticardiolipin antibody binding in sera from patients with syphilis and SLE. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;56:393
40. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid- $\beta$ 2 glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1991; 1:75-82.
41. Sammaritano LR, Lockshin MD, Gharavi AE. Antiphospholipid antibodies differ in antiphospholipid cofactor requirement. *Lupus* 1992;1:83-90.
42. Holmsen H. The platelet: Its membrane, physiology and biochemistry. *Clin Hematol* 1972; 1:235-66
43. Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC. Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest* 1977; 60:866-73.
44. Watson SS, Hableton S: Phosphorylation dependent and independent pathways of platelet aggregation. *Biochem J* 1989; 258:479-85.
45. Ashby B. Mechanisms of platelet activation and inhibition. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990;4:1-23
46. George JN, Lyons RM, Morgan RK. Membrane change associated with platelet activation. Exposure of actin on the platelet surface after thrombin-induced secretion. *J Clin Invest* 1980; 66:1-9.
47. Lloyd JV, Nishizawa EE, Haldar J et al. Changes in  $^{32}$ P labelling of platelet phospholipids in response to ADP. *Br J Hematol* 1972;23:571-85.
48. Zwaal RFA, Comfurius P, Van Deenen LLM: Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature* 1977; 268:358-60.
49. Shick PK, Kurica KB, Chacko GK. Location of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* 1976; 57:1221-6.
50. Sune, A, Bette-Bobillo P, Bienvenue A et al. Selective outside-inside translocation of aminophospholipids in human platelets. *Biochemistry* 1987; 26:2972-8.



51. Tilly RHJ, Senden JMG, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RFA: Increased aminophospholipid translocase activity in human platelets during secretion. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1029:188-90.
52. Averbuch M, Koifman B, Levo Y: Lupus anticoagulant, thrombosis and thrombocytopenia in SLE. *Am J Med Sci* 1987;293:1-5
53. Galli M, Cortelazzo S, Viero P et al: Interaction between platelets and lupus anticoagulants. *Eur J Hematol* 1988; 41:88-94.
54. Delezé M, Alarcón-Segovia D, Oria CV, Sánchez-Guerrero J et al. Hemocytopenia in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1989; 16:926
55. Sánchez-Guerrero J, Alarcón Segovia D. Evolución clínica, tratamiento y causas de muerte en 23 pacientes con síndrome de antifosfolípido primario. (resumen) *Rev Mex Reumatol* 1991:6
56. Cabral AR, Cabiedes J, Sánchez Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Phospholipid specificity of antibodies from patients with primary antiphospholipid syndrome. (enviado a publicación).
57. Harris EN, Gharavi AE, Hodge G et al: Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Hematol* 1985; 59:231-4.
58. Kaplan C, Chamepix P, Blanchard D: Platelet antibodies in SLE. *Br J Hematol* 1987, 67:89-93.
59. Finley PR, Williams J, Fletcher C: Flow cytometry analysis of platelet antibodies. *J Clin Lab Anal* 1988; 2:249-55.
60. Karpatkin S, Strick N, Karpatkin M: Cumulative experience in the detection of antiplatelet antibody in 234 patients with ITP, SLE and other clinical disorders. *Am J Med* 1972;52:776-85.
61. Vázquez Prado J, Tenorio MC, Delezé M, Fernández L et al. Anticuerpos plaquetarios en LEG. *Rev Mex Reum* 1990 (suppl):119
62. Mackworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorder. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:362
63. Connor J, Bucana C, Fidler I: Differentiation dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: Quantitative assesment of outer leaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:3184-88.
64. Khamashta MA, Harris EN, Gharavi AE et al: Immune mediated mechanisms for thrombosis; antiphospholipid antibody binding to platelet membranes. *Ann Rheum Dis* 1988;47:649-54.
65. Ichikawa Y, Kobayashi N, Kawada T et al. Reactivities of antiphospholipid antibodies to blood cells and their effects on platelet aggregations in vitro. *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8:461-8.
66. Haselaar P, Derksen RHWM, Bloksij L, de Groot PG: Crossreactivity of antibodies directed against cardiolipin, DNA, endothelial cells and blood platelets. *Thromb Hemostas* 1990;63:169-73.
67. Rote NS, Dostal-Johnson D, Ng AK, Ault K, Carmody M. Platelet and endothelial cell reactivity of monoclonal antibodies gainst phosphatidylserine and cardiolipin. (resumen) *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8:210

68. Kawaguchi S. Reactivity of mouse antibodies against bromelain-treated mouse erythrocytes with thrombin-treated mouse platelets. *Immunology* 1989; 66:335
69. Rauch J, Meng QH, Tannenbaum H. Interaction of human hybridoma lupus anticoagulant and antiphospholipid antibodies with platelets. *J Immunol* 1987; 139:2598-2604.
70. Pierangeli S, Robinson E, Harris EN. Gold labelled affinity-purified anti-cardiolipin antibodies specifically bind human platelet membranes (resumen) *Arthritis Rheum* 1989; (suppl) 34:122.
71. Out HJ, de Groot PG, van Vliet M, de Gast GC et al. Antibodies to platelets in patients with antiphospholipid antibodies. *Blood* 1991;77:2655-9.
72. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* 1984; 259:9799
73. McNeil HP, Krilis SA, Chesterman CN. Purification of antiphospholipid antibodies using a new affinity method. *Throm Res* 1988;52:641-8
74. Johnston GI, Pickett EB, McEver RP, George JN. Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow cytometry. *Blood* 1987; 69:1401-3.
75. Rauch J, Tannenbaum M, Tannenbaum H, Ramelson H et al. Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems. *J Biol Chem* 1986;261:9672.
76. Rauch J, Janoff AS. Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic. Evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:4112.
77. Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR, Habina L et al. Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody. *J Clin Immunol* 1990;10:141
78. Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J. Correction of thrombocytopenia with small dose aspirin in the primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16:1421.
79. Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Alarcón-Segovia D et al. Natural anticoagulants in systemic lupus erythematosus. Deficiency of protein S bound to C4b associated with recent history of venous thromboses, antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1991;18:552-8.
80. Galli M, Comfurius F, Maasen C, Hemker HC, et al. Anticardiolipin antibodies directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;1:1544.
81. Matsura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichnikawa K et al. Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 2:177
82. McNeil PH, Simpson RJ, Chesterman CN et al. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that include a lipid binding inhibitor of coagulation: Beta 2 glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4120.
83. Schousboe I. Beta 2 glycoprotein I A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985; 66:1086

84. Bevers EM, Galim B, Barbur T, Comfurius P, Zwaal RFA. Lupus anticoagulants IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Hemas* 1991;66:629-32.
85. Fleck RA, Rapaport SI, Mohan Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988;72:512-9.
86. Rosenfeld SI, Looney RJ, Leddy JP, Phipps DC, et al. Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000 molecular weight membrane protein shared by monocytes. *J Clin Invest* 1985;76:2317.
87. McCrae KR, Shattil SJ, Cines DB. Platelet activation induces increased Fc $\alpha$  receptor expression. *J Immunol* 1990; 144:3920-7.
88. Mc Ever RP. The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:87-105.
89. Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6:329-57.
90. Meng QH, Rauch J. A systemic lupus erythematosus-derived human hybridoma autoantibody reactive with antigens expressed on ADP-activated platelets. *J Autoimmun* 1991; 4:447-61.
91. Tan EM, Cohen AS, Fires JF et al: The 1982 revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7
92. Karpatkin S. Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 1985; 22:260-88.