

11262

A
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Post-grado
Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez"

"ANTICUERPO ORGANO-ESPECIFICO EN EL SUERO
DE PACIENTES CON SINDROME ANTIFOSFOLIPIDO
PRIMARIO"

T E S I S

Para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A

M.C. ARNULFO HERNAN NAVA ZAVALA

Asesor: Dr. Pedro A. Reyes López



México, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Agradecimientos:

*A mi hija Graciela del Carmen,
y a mi esposa, María del Carmen:*

*Por compartir siempre con paciencia y amor infinitos, las ilusiones
y esfuerzos que condujeron a esta realidad.*

A mi asesor, Dr. Pedro A. Reyes López:

Por su constante disposición en mi formación como investigador, su ejemplo de excelencia profesional sin perder jamás la esencia de humanismo, y por supuesto, por su amistad.

A los QFB María Eugenia González Ortega y José Luis Bañales Méndez:

Por su amistad y su inapreciable colaboración en el trabajo de laboratorio.

Al personal del laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez":

Porque pacientemente me permitieron ser uno más en el grupo, facilitando en cuanto estuvo a su alcance la realización de mi trabajo, otorgándome además la deferencia de su amistad.

A mis padres, Otilia y Francisco.

A mis sinodales:

Dr. Jorge Alcocer Varela

Dr. Manuel Martínez Lavín

Dr. Pedro A. Reyes López

Dr. Antonio Cabral Castañeda

Dr. José Moreno Rodríguez

Dra. Mary Carmen Amigo Castañeda

Dr. Mario Cardiel Ríos

Por sus siempre valiosas opiniones y su disposición en la
revisión del manuscrito.

INDICE

CONCEPTO	PAGINA
INTRODUCCION	1
I.- Aspectos clínicos relacionados a AFL	1
II.- Características de los AFL	5
III.- Conceptos generales de coagulación y hemostasia	8
IV.- Aspectos patogénicos de los AFL	14
JUSTIFICACION	18
EXPERIMENTOS PREVIOS	19
I.- Estandarización del ELISA para detección de ACL	19
II.- Evaluación del efecto de la inactivación y adsorción de los sueros	20
III.- Evaluación del efecto de la inactivación del suero bovino	23
IV.- Estandarización del ensayo de inmunofluorescencia indirecta para AOE	26
V.- Estandarización de la inhibición de sueros	28
HIPOTESIS	29
OBJETIVO	30
MATERIAL Y METODOS	31
I.- Origen de los sueros	31
II.- Almacenamiento de los sueros	31
III.- Detección de AFL	31
IV.- Inhibición de los sueros	31
V.- Detección de AOE	31
VI.- Cálculo del tamaño de la muestra y tratamiento estadístico	33
RESULTADOS	35
Resultados de la inhibición de los sueros	38
Resultados de la detección de AOE	39
DISCUSION	43
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION

La presencia de anticuerpos antifosfolípidos (AFL) es un fenómeno que ha sido reconocido desde hace varias décadas, especialmente en el campo de las enfermedades infecciosas. Mas reciente es la descripción de anticoagulantes adquiridos que resultaron ser AFL y de anticuerpos contra cardioplipina (ACL) y fosfolípidos aniónicos y zwiteriónicos (1).

Hace 30 años se describió la asociación entre AFL y trombosis venosa o arterial (2,3); con acción anticoagulante en pruebas dependientes de fosfolípidos y "falsas serológicas biológicas" en sujetos con infecciones o enfermedades autoinmunes, casi siempre se trató de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) (1,4,5).

Sin embargo, solo hace aproximadamente 10 años que se introdujo una prueba eficiente y simple para reconocer AFL, lo que permitió su estudio sistemático y propició un incremento en las investigaciones orientadas a definir sus implicaciones clínicas (6).

I.- Aspectos clínicos relacionados a AFL

Se han informado muchas asociaciones clínicas con la presencia de AFL; así tenemos (7):

1.- Trombosis arterial y venosa:

Se ha descrito enfermedad vascular cerebral, arterial periférica, de vasculatura ocular, livedo reticularis. La trombosis venosa tiende a ser recurrente pudiendo asociarse a embolismo

pulmonar con hipertensión pulmonar secundaria. Puede ocurrir en otros sitios, como venas renales, portales y mesentéricas, o expresarse como síndrome de Budd Chiari. En este grupo se incluye también livedo reticularis, condición identificable por un aspecto cutáneo reticulado secundario a dilatación de las venas superficiales. Una variante relacionada es el síndrome de Sneddon, que incluye livedo reticularis, enfermedad cerebrovascular e hipertensión lábil (7).

La trombosis arterial afecta con frecuencia la circulación en sistema nervioso central, siendo el infarto y ataques transitorios de isquemia los más comunes y en ocasiones recurrentes. La trombosis asociada a AFL puede ser fulminante a pesar de tratamiento con anticoagulación.

2.- Manifestaciones neurológicas:

Se han asociado con la presencia de AFL trastornos como a) infarto cerebral; b) ataque isquémico cerebral transitorio; c) embolismo cerebral cardiogénico; d) lesión progresiva aguda y crónica del nervio óptico; e) migraña; f) mielitis transversa; g) encefalopatía difusa y demencia. Se han descrito otras condiciones neurológicas, por ejemplo, corea en pacientes con LES, (7,8).

3.- Pérdida Fetal:

En las pacientes con LES se ha documentado una prevalencia de abortos espontáneos más elevada que en la población general; al comparar las positivas para AFL contra las negativas, las primeras tienen una mayor proporción (hasta 96%) de pérdidas fetales. Se ha encontrado que el ACL isotipo IgG es el marcador más sensible para

pronosticar muerte fetal en pacientes con LES.

Se ha evaluado la prevalencia de AFL en casos con pérdida fetal o abortos recurrentes sin causa aparente, fluctuando del 13 al 42% (9-10). Estos valores son consistentemente mayores al compararlos con el 0 a 10% detectado en población obstétrica general (7,11). Aunque usualmente se considera que la pérdida fetal asociada a AFL se presenta en el segundo trimestre, se sabe que puede ocurrir aborto espontáneo (menos de 20 semanas de gestación) o pérdida fetal (más de 20 semanas). Al estudiar mujeres con anticoagulante lúpico, el 51% terminó con aborto en el primer trimestre y el 29% con muerte fetal en el segundo trimestre (7).

4.- Trombocitopenia y anemia hemolítica:

En los pacientes con LES, la trombocitopenia correlaciona con la presencia de AFL detectándose en el 72% ACL isotipo IgG y se ha informado la asociación de ACL con síndrome de Evans (trombocitopenia y anemia hemolítica). En pacientes con trombocitopenia autoinmune sin enfermedad difusa del tejido conjuntivo se ha descrito también frecuencia elevada de ACL y anticuerpos contra plaquetas (7).

5.- Enfermedad cardíaca:

Además de la posibilidad de fenómenos oclusivos de vasculatura coronaria, se ha reconocido la prevalencia elevada de lesiones valvulares en pacientes con AFL (7,12). Al parecer en la valvulopatía predomina la insuficiencia y estructuralmente se encuentra engrosamiento e incluso vegetaciones, sospechándose relación con endocarditis de Libman-Sachs (7). En un estudio

multicentrico (12) efectuado en 132 pacientes con LES, dirigido a analizar la asociación entre la presencia de AFL y valvulopatía, se informó una mayor frecuencia de vegetaciones valvulares (8 de 50 contra 1 de 82) e insuficiencia mitral (19 de 50 contra 10 de 82) en los pacientes positivos para AFL.

Por otro lado, se han informado aisladamente casos de pacientes con lupus eritematoso generalizado y crisis addisoniana, positivos para ACL (13-15); proponiéndose como mecanismo patogénico potencial a la hemorragia suprarrenal bilateral sin vasculitis. Se ha especulado también acerca de la probable relación entre AFL con enfermedad tiroidea y trombocitopenia (16).

Síndrome antifosfolípido (SAF):

Aunque la presencia de AFL se observa también en enfermedades infecciosas, las manifestaciones asociadas a los AFL se han descrito característicamente en el contexto de pacientes con enfermedad autoinmune, en especial LES (7). La relación LES/AFL parece irse conociendo a la luz de hallazgos como los informados por Alarcón-Segovia (17), que en una serie de 500 pacientes con LES detectaron una fuerte asociación positiva de trombosis venosa, trombocitopenia, anemia hemolítica, úlceras en miembros inferiores y pérdida fetal repetida con la presencia de AFL. Se encontró también una asociación significativa pero menos intensa entre AFL y oclusión arterial, livedo reticularis y mielitis transversa. Con estos antecedentes, definieron el SAF como la ocurrencia de por lo menos dos de los eventos mencionados en presencia de AFL. Estos hallazgos han sido confirmados por el mismo grupo al

continuar el seguimiento e incrementar el número de casos a más de 600 (18) y proponer criterios de clasificación para el SAF en el contexto de pacientes con LES (19).

Se ha descrito también pacientes que reúnen manifestaciones clínicas suficientes para considerar la presencia de SAF (por lo menos dos de las manifestaciones asociadas en presencia de AFL persistentemente positivos), pero sin manifestaciones conspicuas de enfermedad autoinmune concurrente (20, 21). Así, actualmente se considera que el SAF puede clasificarse como: secundario (pacientes con LES u otra enfermedad relacionada) o primario (SAFP) (pacientes sin enfermedad sistémica autoinmune)(17-21).

II.- Características de los AFL.

Entre las características identificadas destacan:

1) Isotipo, habiéndose informado asociación de manifestaciones clínicas predominantemente con ACL IgG, aunque algunas, por ejemplo el síndrome de Evans se ha propuesto con ACL IgM (7,17). Algunos casos de vegetaciones valvulares cardíacas se han informado asociados a ACL IgM solo (12), aunque la mayoría de casos positivos para ACL IgM también lo son para ACL IgG. La determinación del isotipo IgA no parece enriquecer el escrutinio (17), lo que ha llevado incluso a excluir su búsqueda en el seguimiento de series importantes de pacientes (18).

2) Subclases de IgG, en los AFL de LES hay predominio de IgG2 e IgG4 así como de cadenas ligeras lambda; en los AFL de sífilis la

IgG1 e IgG3 y las cadenas ligeras kappa. La proporción normal de cadenas ligeras es de 66% kappa y el resto lambda aproximadamente (7).

3) Especificidad; los AFL encontrados asociados a LES principalmente parecen unirse a fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico además de cardioplipina y son inhibidos preferentemente por cardioplipina en su forma pura. Los AFL asociados a sífilis probablemente reconocen diferentes epítopes, ya que parecen reaccionar preferentemente con fosfolípidos neutros (zwiterionicos) y son inhibidos por cardioplipina como parte del antígeno del VDRL (cardioplipina, colesterol y fosfatidilcolina) (7). La identificación del epítipo en el fosfolípido aún no es clara, pero se han encontrado componentes importantes, como el grupo fosfodiéster y la cabeza polar cargada negativamente. También la longitud de la cadena y el grado de saturación parecen influir, ya que los AFL de LES se unen mejor a fosfatidilglicerol con 18 átomos de carbono y un doble enlace por cadena (C18:1) que a fosfatidilglicerol C16:0 ó C14:0, y no se unen al fosfatidilglicerol C12:0. Otro aspecto que parece participar es la estructura del fosfolípido, mostrando en ratones mayor antigenicidad la fase hexagonal que la lamelar de fosfatidiletanolamina (FE).

Se ha descrito la participación de una glicoproteína sérica en la reacción de ACL con CL en el ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA) (22,23), se trata de la beta-2-glicoproteína I, que es una cadena sencilla de 50 kd compuesta por 326 aminoácidos y

cuya concentración en el plasma humano es de aproximadamente 200 microgramos/ml. Se considera como un cofactor sérico que favorece la unión a fosfolípidos de los AFL de pacientes con enfermedades autoinmunes pero no de los AFL de pacientes con enfermedades infecciosas (24). Se sabe que es inmunogénica por si misma y que su unión con cardiolípidina probablemente modifica estructuralmente la molécula de fosfolípido resultando en un epítope inmunogénico que estimula la formación de AFL . Al inmunizar ratones con β 2-glicoproteína I sola, cardiolípidina sola, β 2 más cardiolípidina y un grupo con buffer (25), los ratones inmunizados con beta2 más cardiolípidina desarrollaron niveles altos de anticuerpos contra ambas moléculas y mostraron fuerte reactividad cruzada con dioleoilfosfatidiletanolamina que es un fosfolípido en fase hexagonal II, algunos de estos anticuerpos tenían actividad de anticoagulante lúpico. Los ratones inmunizados con cardiolípidina sola no produjeron AFL y los inmunizados con beta2 sola desarrollaron anticuerpos contra beta2 pero no contra fosfolípido. Así, estos investigadores sugieren que la cardiolípidina sufre un cambio conformacional al interactuar con la apolipoproteína H y esto proporciona el epítope inmunogénico.

Por otro lado, se ha propuesto reactividad cruzada con los anticuerpos contra DNA de doble cadena (26), algunos en base a estudios que incluían anticuerpos monoclonales y parecía hacer sentido porque el grupo fosfato de la cabeza polar del fosfolípido semejava la parte fosfodiéster del DNA, aunque otros investigadores no confirman esta impresión (27,28). Cuando se

prueban en ELISA, los AFL relacionados a autoinmunidad muestran un mayor grado de afinidad que los asociados a sífilis (7).

4) Aspectos inmunogenéticos de los AFL; se han informado casos de anticoagulante lúpico con patrón familiar, presencia de ACL isotipo IgG en los 4 miembros de una familia (7). Al evaluar presencia de ACL en 22 pacientes con LES y 101 familiares en primer grado, se encontró positividad en 18% de los pacientes y 8% de los familiares, pero solo 3 de estos últimos se asociaban a probando positivo para ACL (29). En relación a los AFL y antígenos del complejo principal de histocompatibilidad, algunos investigadores no encuentran asociaciones (29). Otros han encontrado asociación de ACL con: HLA-DR7 en pacientes con LES originarios del norte de Italia (30), con el alelo nulo C4 en negros americanos con LES (31), con DR4 en pacientes con LES (32,33). Existe evidencia que implica al alelo DRw53 y al DQw7 en la positividad para ACL incluyendo pacientes con SAFP (34-36). En un estudio reciente en 17 pacientes mexicanos con SAFP se encontró asociación con los alelos DR5 y DRw52 y no con los descritos en pacientes caucásicos o negros (37).

III- Conceptos generales de coagulación o hemostasia (38):

1.- Hemostasia Primaria: es la formación rápida de tapones plaquetarios en los sitios de lesión y detiene la hemorragia de capilares, arteriolas pequeñas y venulas. Hemostasia secundaria ó formación de fibrina: mediada por el sistema plasmático de

coagulación y requiere más tiempo para completarse. En esta reacción filamentos de fibrina refuerzan el tapón hemostático primario. Tiene importancia en grandes vasos y evita la hemorragia secundaria horas o días después de la lesión inicial.

La eficacia de la hemostasia primaria requiere de: adhesividad plaquetaria, pocos segundos después de la lesión las plaquetas se adhieren a fibrillas de colágeno en el subendotelio vascular, esta interacción se facilita por el factor de Von Willebrand, una glucoproteína adhesiva que forma un enlace entre los sitios receptores plaquetarios y las fibrillas de colágeno subendoteliales, permitiendo a las plaquetas permanecer unidas a la pared vascular a pesar del flujo sanguíneo. En seguida, las plaquetas adheridas generan y secretan mediadores como difosfato de adenosina (ADP), factor Va, trombospondina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de Von Willebrand, fibrinogeno, fibronectina, etc. La activación y secreción plaquetarias son reguladas por cambios en el nivel de nucleótidos cíclicos, por el influjo de calcio, la hidrólisis de fosfolípidos de membrana y la fosforilación de proteínas intracelulares. La unión de agonistas como adrenalina, colágeno o trombina a los receptores de la superficie plaquetaria activan dos enzimas de membrana: fosfolipasa C y fosfolipasa A2; estas enzimas catalizan la producción de ácido araquidónico a partir de dos de los principales fosfolípidos de la membrana, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina. Al principio una pequeña cantidad del ácido araquidónico liberado se convierte en tromboxano A2 (TxA2), el que

a su vez puede activar la fosfolipasa C. La formación de TxA2 a partir de ácido araquidónico es mediada por la enzima ciclooxigenasa, la cual es inhibida por aspirina y antiinflamatorios no esteroideos. La inhibición de TxA2 es una causa común de hemorragia y es el fundamento de la acción de algunos fármacos antitrombóticos.

La hidrólisis del fosfolípido de la membrana, disfosfato-4, 5-fosfatidilinositol (PIP2) produce diacilglicerol (DAG) y trifosfato de inositol (IP3) que poseen una función de enorme trascendencia en el metabolismo plaquetario. El IP3 es mediador del paso de calcio al citosol plaquetario y estimula fosforilación de las cadenas ligeras de miosina. Estas últimas interactúan con actina para facilitar el movimiento granular y el cambio de forma de las plaquetas. El DAG activa la proteincinasa C, la que a su vez fosforila una proteína de 47,000 daltons que controla la secreción granular plaquetaria.

Existe un mecanismo finamente equilibrado que controla la velocidad y magnitud de la activación plaquetaria. El TxA2 aumenta la actividad de fosfolipasa C que estimula la secreción y activación plaquetaria. En contraste, la prostaciclina PGI2, producto del ácido araquidónico en células endoteliales, inhibe la actividad de fosfolipasa y eleva los niveles intraplaquetarios de AMPc que a su vez inhibe la activación plaquetaria.

Después de la activación, las plaquetas secretan hacia el plasma su contenido de granulos. Los lisosomas liberan endoglucosidasa y una enzima que desdobla la heparina; de los

granulos densos salen calcio, serotonina y ADP; de los granulos alfa varias proteínas, entre ellas, factor de Von Willebrand, fibronectina, trombospondina y proteína neutralizante de heparina (factor plaquetario 4). El ADP liberado modifica la superficie plaquetaria, de manera que el fibrinogeno puede unirse a un complejo formado entre glucoproteínas IIB y IIIa de la membrana, y así adherir plaquetas adyacentes para formar un tapón hemostático. Otra proteína de granulos alfa, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), estimula el crecimiento y la migración de fibroblastos y células de músculo liso en la pared vascular, que forman parte importante del proceso de reparación.

2.- Hemostasia secundaria: en esta fase, una vez formado el tapón hemostático primario, se activan proteínas plasmáticas de coagulación. La finalidad de esta reacción es la formación de trombina suficiente para convertir una pequeña porción de fibrinógeno plasmático en fibrina, el control de la reacción depende en gran medida de la participación de varios inhibidores.

Con fines didácticos la coagulación plasmática puede describirse en 4 fases:

a) fase de coagulación intrínseca o de contacto, aquí tres proteínas plasmáticas que son factor de Hageman (factor XII), cininógeno de alto peso molecular (HMWK) y precalicreina (PK) forman un complejo con el colágeno subendotelial vascular. Después de unirse al HMWK el factor XII se convierte lentamente en una proteasa activa (XIIa) que convierte la PK en calicreína y el factor XI a su forma activa (XIa). La calicreína acelera la

conversión de XII en XIIa, en tanto que XIa participa en reacciones de coagulación subsecuentes. b) esta fase constituye una segunda vía para iniciar la coagulación al convertir el factor VII en una proteasa activa. En esta vía extrínseca o dependiente de factores histicos, se forma un complejo entre factor VII, calcio y el factor histico (una lipoproteína que esta en casi todas las membranas celulares y que aparece después de daño celular). Para su actividad biológica el factor VII y otras tres proteínas de coagulación, los factores II (protrombina), IX y X necesitan calcio y vitamina K. Estas proteínas se sintetizan en el hígado, en donde una carboxilasa dependiente de vitamina K cataliza una singular modificación ulterior a la traducción y agrega un segundo grupo carboxilo a ciertos residuos de ácido glutámico. c) En esta fase el factor X se activa por las proteasas generadas en las dos reacciones anteriores. En una reacción se forma un complejo dependiente de calcio y lípidos entre los factores VIII, IX y X. Dentro del complejo, en primer lugar se convierte el factor IX en IXa for efecto del factor XIa que se generó en la vía intrínseca. Luego se activa el factor X por el IXa, con la participación del VIII. Como otra posibilidad, el factor X puede activarse más directamente por el VIIa generado a través de la vía extrínseca. La activación del factor X constituye un eslabón importante entre ambas vías de la coagulación. d) en esta fase se convierte protrombina en trombina en presencia de factor V, calcio y fosfolípidos. La conversión de protrombina puede llevarse a cabo en varias superficies naturales y artificiales ricas en fosfolípidos

pero se acelera varios miles de veces en la superficie de plaquetas activadas. La trombina, producto de esta reacción, tiene muchas funciones en la hemostasia; la principal es la conversión de fibrinógeno a fibrina, pero también activa a los factores V, VIII, XIII y estimula la agregación y secreción plaquetarias. Después de la liberación de fibrinopéptidos A y B de las cadenas alfa y beta de fibrinogeno, la molecula modificada, llamada ahora monómero de fibrina, se polimeriza en un gel insoluble. Luego se estabiliza el polimero de fibrina por entrecruzamiento de cadenas individuales por acción del factor XIIIa, una transglutaminasa plasmática.

3.- Fibrinolisis: después de la formación del tapón hemostático definitivo o coagulo, comienza la reparación vascular. El activador de plasminógeno tisular (TPA) difunde de células endoteliales y convierte en plasmina el plasminógeno adsorbido al coagulo de fibrina. Luego la plasmina degrada al polímero de fibrina en pequeños fragmentos que son eliminados por el sistema monocito-macrófago. Aunque la plasmina también puede degradar fibrinógeno, la reacción permanece localizada porque a) el TPA es más eficaz sobre el plasminógeno adsorbido a coagulos de fibrina b) cualquier plasmina que penetra en la circulación es unida y neutralizada rapidamente por el inhibidor de alfa-2-plasmina.

Como se menciona, el sistema plasmático de coagulación esta regulado con enorme exactitud, de manera que solo una mínima cantidad de cada enzima de coagulación se convierte en su forma activa y el tapón hemostático no se propaga más alla del sitio de la lesión. La fluidez de la sangre es perpetuada por la propia

circulación que reduce la concentración de sustancias reactivas, la adsorción de factores de coagulación a superficies y la presencia de inhibidores plasmáticos.

Los inhibidores comentados tienen diferentes mecanismos de acción, la antitrombina forma complejos con todos los factores de coagulación de proteasas de serina, excepto el VII. Las velocidades de formación de complejos se aceleran por moléculas de heparina y heparinoides en la superficie de células endoteliales. Esta capacidad de la heparina para acelerar la capacidad de antitrombina es fundamental para la acción de la heparina como anticoagulante potente. La proteína C es convertida en proteasa activa por la trombina, después de unirse a una proteína de las células endoteliales llamada trombomodulina. Luego la proteína C activada inactiva los cofactores plasmáticos V y VIII para lentificar dos reacciones críticas de coagulación. También la proteína C puede estimular la liberación de TPA de las células endoteliales. La función inhibitoria de la proteína C es reforzada por la proteína S. Como cabría predecir, los niveles reducidos de antitrombina o proteínas C y S o formas disfuncionales de la molécula, producen un estado hipercoagulable o protrombótico.

IV.- Aspectos patogénicos de los AFL:

Se ha propuesto que la actividad patogénica de los AFL podría estar relacionada a interacción con procesos de la coagulación dependientes de fosfolípidos, incluyendo la activación y

agregabilidad plaquetaria, la coagulación plasmática y la función de las células endoteliales (CE) que es determinante en el equilibrio de las vías procoagulantes y fibrinolíticas (7,39,40). La posibilidad de reacción y quizá daño celular mediado por AFL ha sido motivo de especulación (40). Entre las posibilidades se han informado:

1.- Interacciones con procesos de la coagulación:

a) Disminución de la producción de prostaciclina por las CE, por interferencia de los AFL impidiendo la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. Se ha encontrado disminución en la producción de prostaciclina al agregar suero con AFL en modelos in vitro aunque el fenómeno no es consistente (7). Recientemente, se ha confirmado la inhibición de la producción de prostaciclina inducida por trombina en cultivo de CE obtenidas de cordón umbilical humano cuando se les agrega suero de pacientes con anticoagulante lúpico (41) y se sabe que solamente el suero obtenido de plasma pobre en plaquetas es capaz de inhibir la producción de prostaciclina inducida por trombina en cultivo de CE de cordón umbilical humano (42). En otro estudio en 25 pacientes con anticoagulante lúpico y ACL se encontró elevado el metabolito urinario del tromboxano A₂ y disminuido el de la prostaciclina; con estos datos se sugiere una activación plaquetaria prolongada con una pobre respuesta compensatoria de las CE (43).

b) Interferencia con la función de la trombomodulina, pudiendo inhibir la formación dependiente de fosfolípido del complejo formador de PCA y del complejo inhibidor de los cofactores. Estos

complejos son análogos de el complejo de protrombinasa que es inhibido por los anticoagulantes lúpicos. Se ha descrito la inhibición de la activación de la proteína C por IgG en pacientes con inhibidores no específicos (7). Se ha observado neutralización del efecto inhibitorio de AFL IgG cuando se incuba con exceso de fosfolípido, en cambio, otro grupo no encontró interferencia en la activación de la proteína C al agregar IgG con actividad de anticoagulante lúpico. Con esta evidencia se ha propuesto que los AFL pueden interferir con la activación de la proteína C o con su actividad funcional (44,45,7).

2.- Reactividad con superficies celulares

a) Anticuerpos contra células endoteliales (ACE): Se han descrito en suero de pacientes con LES, pueden tener reactividad cruzada con AFL y probablemente ser el mismo anticuerpo en algunos casos de LES con anticoagulante lúpico que muestran inhibición importante de los ACE al incubar estos sueros con liposomas de cardiolipina (7). La unión de estos ACE con las CE puede asociarse a lesión y depósito de complejos inmunes, activación del complemento y ruptura de la monocapa de CE humanas en cultivo (46-49).

b) Interacción de AFL con plaquetas y eritrocitos: Se a descrito unión de AFL a plaquetas descongeladas pero no a plaquetas "intactas", sugiriendo que un estímulo pre-existente permite este fenómeno. Otro investigador encontró pobre reactividad de un anticuerpo monoclonal con actividad de anticoagulante lúpico contra plaquetas intactas in vitro y otro trabajo informa de AFL que

reaccionan solo con linfocitos activados (50-52)

Los AFL pueden reaccionar contra los fosfolípidos con carga negativa de las paredes plaquetaria y eritrocitaria, incluyendo fosfatidilserina la cual tiene reacción cruzada con cardiolipina, que no es en si misma un constituyente de las paredes celulares. Sin embargo los fosfolípidos cargados negativamente normalmente no son expresados en la superficie de la pared celular de eritrocitos ni plaquetas, ya que de lo contrario inducirían actividad procoagulante permanente (40).

JUSTIFICACION

El papel patogénico de los AFL no es claro en muchos aspectos. Considerando la ubicuidad de los fosfolípidos en las paredes celulares (53) y la reactividad cruzada de los ACL con componentes celulares (54), es pertinente reconocer si los AFL son capaces de reaccionar con células o estructuras diferentes a las mencionadas (eritrocitos, plaquetas, células endoteliales).

Al respecto, se ha postulado asociación de los AFL con insuficiencia adrenal aguda y enfermedad tiroidea (13-16), quizá como consecuencia de trombosis, aunque no se ha evaluado de manera sistemática su potencial relación con rasgos serológicos de enfermedad inmune órgano-específica. Si se demuestra que los pacientes con SAFP tienen anticuerpos capaces de unirse a otras células, deberá investigarse si corresponden a anticuerpos órgano-específicos o si se trata de los mismos AFL reaccionando contra diversos órganos. En este contexto resulta atractivo estudiar serológicamente a los pacientes con SAFP.

Con el propósito de investigar las posibilidades mencionadas, realizamos los siguientes experimentos para estandarizar algunos métodos necesarios.

EXPERIMENTOS PREVIOS

I.- Estandarización del ELISA para detección de anticuerpos anticardiolipina.

Se estandarizó el ELISA de acuerdo a descripción previa (55) con algunas modificaciones (56), el procedimiento consiste en: 1) sensibilizar placas de micropozos (NUNC) con 1500 ng/pozo de cardiolipina disuelta en etanol y se deja secar en sistema de vacío con atmósfera inerte. 2) Bloquear con 300 microlitros/pozo de amortiguador salino de fosfatos 10 mM pH 7.4 conteniendo suero de bovino neonato al 10% (PBS.SBN), incubar 2 horas a temperatura ambiente. 3) Lavar cuatro veces con amortiguador salino de fosfatos 10 mM pH 7.4 sin suero bovino (PBS), 300 µL/pozo/lavado. 4) Añadir por triplicado 100 microlitros de la dilución 1:100 del suero del paciente en PBS.SBN, incubar 1 hora a temperatura ambiente. 5) Lavar cuatro veces 6) Añadir Anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (hecho en cabra), incubar 1 hora a temperatura ambiente. 7) Lavar cuatro veces 8) Añadir solución de ortofenilendiamina y peróxido de hidrógeno, incubar 15 minutos y parar la reacción con ácido sulfúrico 2N. 9) Leer a 490 nm.

Se incluyeron 56 sueros de sujetos clínicamente sanos para obtener el punto de corte, el cual se calculó como promedio + 5 desviaciones estándar (19). Se preparó una poza de 8 sueros de pacientes con SAFF para utilizarlo como control positivo y sobre sus títulos se calculó el coeficiente de variación, que fue de 11% utilizando las unidades crudas del ensayo (tabla 1). Se preparó

también una poza de sueros de SCS, que se incluyó en todas las placas.

TABLA 1. Valores en densidades ópticas obtenidos con los sueros de 56 sujetos clínicamente sanos (SCS) en el ensayo inmunoenzimático para anticuerpos anticardiolipina.

Promedio ± D.E.	Promedio ± 5 D.E. (punto de corte)	C.V.
0.030	0.210	11%

D.E. Desviación estándar

C.V. Coeficiente de Variación

II.- Evaluación de el efecto de la inactivación por calor y adsorción con eritrocitos de carnero de los sueros de pacientes con SAFP y sujetos clínicamente sanos en los títulos de anticuerpos anticardiolipina.

En la metodología de laboratorio que planeabamos emplear en esta investigación se incluía la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el escrutinio de anticuerpos órgano-específicos (57); en esta técnica generalmente se recomienda a) inactivar a 56 centígrados por 30 minutos los sueros a probar y b) adsorber los sueros a probar con eritrocitos de carnero (vol:vol) en especial al utilizar corazón de rata como antígeno. Sin embargo conocíamos por lo menos un informe que proponía que la inactivación por calor de los sueros de sujetos normales provocaba aumento importante en los títulos de anticuerpo anticardiolipina (58) y no encontramos información de el efecto de esa manipulación en el suero de

pacientes con SAFP. Por otro lado, la adsorción con eritrocitos de carnero (los cuales expresan fosfolípidos en su membrana) podría causar disminución de los títulos de ACL en los sueros de SAFP. Con el objeto de evaluar el efecto de la inactivación y adsorción probamos para ACL suero de 7 pacientes con SAFP y 21 sujetos clínicamente sanos, las manipulaciones se efectuaron de la siguiente forma:

Inactivación de los sueros: se colocan 150 microlitros en tubo eppendorf de 250 microlitros, tapado y se incuba a 56 centígrados por 30 minutos.

Adsorción de los sueros: el suero diluido 1:10 en PBS 10 mM pH 7.3 se mezcla vol:vol con paquete de eritrocitos de carnero, lavados con solución salina, incubándose a 37° centígrados por 15 minutos, se centrifuga y se trabaja con el sobrenadante.

La tabla 2 muestra las densidades ópticas obtenidas en los sueros de pacientes con SAFP (n=7) y no hay diferencia estadística en los títulos de ACL, pero llama la atención la disminución mayor al 50% al adsorber los sueros 1 y 2; una explicación hipotética es el tipo de fosfolípidos que expresan los eritrocitos, que son preferentemente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (53).

La tabla 3 muestra los resultados en promedio de ambos grupos y en el de SCS es clara la elevación en los títulos cuando los sueros son inactivados ($p < 0.05$).

Este hecho confirma que se trata de un fenómeno reproducible. Cheng (58) mostró que este aumento se encontraba en la fracción IgG y era adsorbible con cardiolipina, lo que permite suponer que se

trata de un anticuerpo que por algún motivo se torna detectable.

TABLA 2. Densidades ópticas de sueros de pacientes con síndrome antifosfolípido primario.

Caso	Basal	Adsorbido	Inactivado	Inactivado/Adsorbido
1	1.016*	0.479	1.224	0.878
2	0.325	0.160	0.324	0.267
3	2.659	2.318	2.604	2.552
4	1.922	1.730	1.792	1.539
5	1.090	0.604	1.039	0.563
6	0.396	0.463	0.643	0.678
7	0.398	0.622	0.831	0.862

* Ensayo inmunoenzimático para anticuerpos anticardiolipina.

TABLA 3. Efecto de la inactivación por calor y adsorción con eritrocitos ovinos de los sueros en el título de anticuerpos anticardiolipina.*

Condiciones Probadas				
Grupo (n)	Basal	Adsorbido	Inactivado	Inactivado/Adsorbido
SAFP** (7)				
Promedio	1.100	0.910	1.200	1.000
D.E.	0.880	0.790	0.760	0.780
p > 0.05				
SCS* (21)				
Promedio	0.043	0.027	0.265	0.248
D.E.	0.073	0.051	0.100	0.096
p < 0.05				

* Densidad óptica en ensayo inmunoenzimático. ** Síndrome antifosfolípido primario. * Sujetos clínicamente sanos.

La proposición de un factor sérico termolábil como causa de este fenómeno es atrayente y requiere de mayor caracterización molecular, mientras tanto solo podemos especular al respecto. La

adsorción de los sueros basales e inactivados de SCS no modificó sus títulos, a pesar de que los eritrocitos expresan fosfolípidos en su superficie (53). Estos hallazgos nos permitieron establecer que los sueros deberán probarse sin inactivar en el ELISA para ACL, incluyendo los utilizados para obtener el punto de corte.

III.- Evaluación de la inactivación del suero bovino utilizado como diluyente y bloqueador en el ensayo inmunoenzimático para anticuerpos anticardiolipina; efecto en los títulos detectados en sueros de pacientes con SAFP y sujetos clínicamente sanos.

El hallazgo confirmatorio de aumento en los títulos de ACA después de inactivar los sueros de sujetos clínicamente sanos motivo la consideración de que el fenómeno podría presentarse también al inactivar el suero bovino utilizado en el ELISA y por lo tanto asociarse a discrepancias importantes en los títulos de ACA detectados. Para evaluar este punto decidimos probar simultáneamente sueros de 8 pacientes con SAFP y 8 sujetos sanos.

Los valores individuales obtenidos con los sueros de SAFP (fig 1) muestran una disminución importante de los títulos de ACL cuando se utiliza el ESBI comparado con el ESBB. Los sueros de SCS no mostraron cambios significativos (tabla 4). Estos resultados confirman y enriquecen los fenómenos descritos de resultados incongruentes en el ELISA para ACL cuando se introducen cambios térmicos en los reactantes como el bien conocido fenómeno de

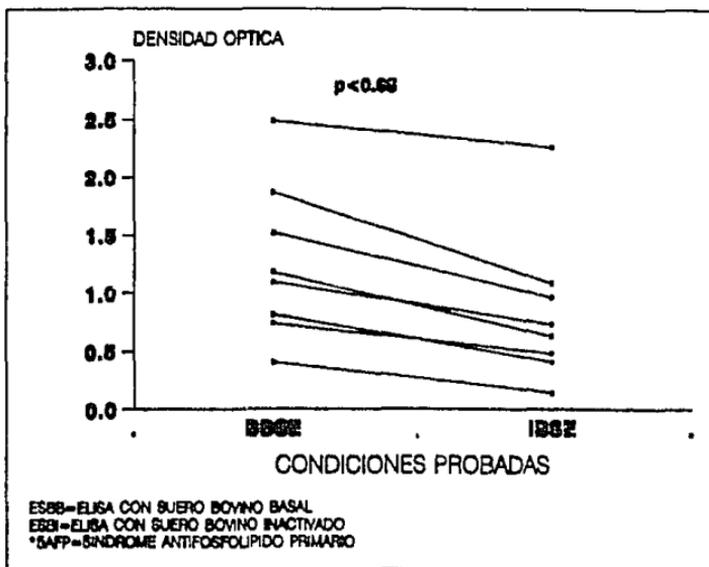


Fig 1.- Sueros de 8 pacientes con SAFP, probados simultaneamente para ACL usando ESBB comparado contra ESBI.

elevacion de los titulos de ACL postinactivacion de sueros de SCS (56,58). En este trabajo observamos un fenomeno probablemente relacionado cuando inactivamos el suero bovino usado para bloquear los sitios libres de antígeno en el ELISA para ACA. Nuestros hallazgos muestran que la inactivacion del suero bovino del ELISA para ACA produce una disminucion significativa en los titulos de ACA detectados en suero de sujetos con SAFP cuando se comparan con los del ELISA con suero bovino basal.

Tabla 4.- Títulos séricos de anticuerpos anticardiolipina en pacientes con síndrome antifosfolípido primario (SAFP) y sujetos clínicamente sanos (SCS).

Grupo	n	condiciones probadas			
		ESBB		ESBI	
		Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
SAFP	8	1.415	0.696	0.958	0.651
$p < 0.05$					
SCS	8	0.122	0.017	0.113	0.009
$p > 0.05$					

ESBB = ELISA con suero bovino basal, ESBI = ELISA con suero bovino inactivado, D.E. = Desviación estandar, n = número de casos.

Es probable que la inactivación del suero bovino produzca un aumento de los ACA del propio suero bovino y que se produzca un fenómeno de competencia por antígeno asociado a la molécula de anticuerpo aunque no necesariamente en su porción fijadora de antígeno. Así, cuando en el ELISA se añaden las muestras de suero humano, estas encuentran los sitios de antígeno ocupados por los ACA manifestados en el suero bovino inactivado que previamente se utilizó para bloquear. En este sentido, entre mayor la cantidad de ACA que manifieste el suero bovino inactivado, menor el número de ACA de las muestras de suero humano que se unirán al antígeno con la consecuente disminución de los títulos de ACA (59).

Estos resultados fundamentaron nuestra proposición de utilizar

consistentemente en el ELISA para ACA el suero bovino sin inactivar.

IV. Estandarización del ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos órgano-específicos.

Se identificaron con ensayo de IFI usando como antígeno cortes de 4 micras de órgano de rata (estómago, riñón, hígado, corazón y lengua) y de órgano de mono (tiroides). La técnica se aplicó según descripción previa (57), con algunas modificaciones: Se colocan los tejidos en portaobjetos con pizarra, preparados con metasilicato de sodio. Se almacenan a -70°C por un máximo de dos semanas. Para su uso, se dejan secar (no desecar) espontáneamente en la cámara húmeda (no utilizar solvente orgánico), se agrega el suero problema diluido 1:10 en PBS 10 mM Ph 7.3 con 1% de suero humano normal depletado de inmunoglobulinas. Se incuba por 30 minutos, lavar 7 minutos 2X con PBS 10 mM pH 7.3; agregar anti IgG humana fluoresceinada, incubar por 30 minutos, lavar 2X. Secar y montar cubreobjetos utilizando glicerol:barbital.

Las recomendaciones habituales con la intención de evitar fenómenos de fluorescencia inespecífica, incluyen: 1) adsorber con eritrocitos de carnero los sueros a probar. Al conocer el fenómeno de disminución de los títulos de ACA post-adsorción de los sueros de SAFP se decidió probarlos en su estado basal. 2) inactivar con calor los sueros a probar. Inactivación con calor de los sueros,

manipulación que evidentemente afecta la expresión natural de los AFL. 3) fijar con solvente orgánico los tejidos utilizados como antígenos.

Otras recomendación inquietante era la fijación con solvente orgánico de los tejidos utilizados como antígenos, maniobra que probablemente afectaría los componentes fosfolipídicos.

En estas condiciones decidimos evaluar el efecto de la inactivación de los sueros a probar y de la fijación con solvente orgánico del tejido utilizado como antígeno en la frecuencia de fluorescencia inespecífica en la detección de AOE por IFI, para tal efecto probamos suero de 19 SCS en las condiciones descritas en la tabla (5), evaluando la presencia de fluorescencia inespecífica.

Tabla 5. Evaluación de fluorescencia inespecífica en 19 sueros de sujetos clínicamente sanos.

Condición	Laminilla fijada		No fijada	
	POS	NEG	POS	NEG
SUERO BASAL	5	14	4	15
SUERO ADSORBIDO	3	16	2	17

De acuerdo a nuestros resultados decidimos efectuar el escrutinio de anticuerpos órgano-específicos sin fijar el tejido con solvente orgánico y probar los sueros problema en condición basal e inhibidos con cardioplipina.

V.- Estandarización de la inhibición de sueros de SAFF positivos para ACL :

Se realizó de acuerdo a descripción previa (60,61), con algunas modificaciones:

Se prepararon las micelas de cardioplipina a concentración de 2 mg/ml en PBS pH 7.4, 10 mM mezclando vol:vol con suero problema previamente diluido 1:5 en PBS; se incubó una hora a 37°C, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y se proceso el sobrenadante en ELISA e IFI ajustando sus diluciones respectivas.

Se inhibieron con micelas de cardioplipina 8 sueros de SAFF y 8 de SCS, obteniendo inhibiciones entre 65 y 99% referente al basal en los sueros positivos y sin modificaciones del título en los sueros de SCS (tabla 6).

Tabla 6. Inhibición con micelas de cardioplipina de sueros de pacientes con síndrome antifosfolípido primario. Efecto en los títulos de anticuerpo anticardioplipina detectados en ensayo inmunoenzimático.

No.Suero	Basal	Inhibido	Diferencia B-I	% Del Basal
1	2.567	0.671	1.896	74
2	1.621	0.398	1.223	75
3	1.198	0.208	0.990	83
4	1.792	0.177	1.615	90
5	0.768	0.110	0.658	86
6	0.416	0.003	0.413	99
7	1.881	0.621	1.260	67
8	0.914	0.120	0.794	87

Estos resultados se consideraron adecuados para efectuar las pruebas posteriores.

HIPOTESIS

Hipótesis nula:

- A) El suero de los pacientes con SAFP tiene anticuerpo órgano-específico con la misma frecuencia que el suero de sujetos clínicamente sanos.
- B) La actividad de anticuerpo órgano-específico de el suero de pacientes con SAFP no es adsorbible con cardioplipina.

Hipótesis alternativa:

- A) El suero de pacientes con SAFP tiene anticuerpo órgano-específico con mayor frecuencia que el suero de sujetos clínicamente sanos.
- B) La actividad de anticuerpo órgano-específico de el suero de pacientes con SAFP es adsorbible con cardioplipina.

OBJETIVOS

- 1) Describir la frecuencia de actividad de anticuerpo órgano-específico en el suero de pacientes con SAFP y SCS.
- 2) Demostrar que dicha actividad órganoespecífica es o no adsorbible con cardiolipina.

MATERIAL Y METODOS

Es un estudio prolectivo, transversal, descriptivo.

I.- Origen de los sueros:

Grupo I) Se incluyeron sueros de pacientes del INCICH que reunían los criterios propuestos por Alarcón-Segovia (20) para síndrome antifosfolípido, excluyéndose los pacientes con otra enfermedad difusa del tejido conjuntivo o enfermedad infecciosa crónica que antecedía al cuadro de síndrome antifosfolípido. Cuando el paciente presentaba evidencia de infección aguda a juicio del médico tratante, las tomas se efectuaron por lo menos un mes después de la resolución del cuadro. Se eliminaron las muestras de los pacientes en que se detectó otra enfermedad difusa del tejido conjuntivo o infecciosa crónica durante el seguimiento.

1.- Definición de criterios de síndrome antifosfolípido:

Trombosis venosa: cualquier episodio de trombosis venosa profunda que ocurra sin otra causa aparente, con cuadro clínico característico diagnosticado por el médico y con corroboración por venograma o estudio gamagráfico de preferencia. **Embolia pulmonar:** se considera como otro criterio si ocurre asincrónicamente con otros episodios trombóticos. **Hipertensión pulmonar trombo-oclusiva:** cuando el patrón hemodinámico lo sugiera, o de ser posible con prueba histológica. **Trombocitopenia:** cuenta por debajo de 100,000 en dos ocasiones. **Anemia hemolítica:** caída de

hemoglobina sanguínea de por lo menos 3 g/dl y reticulocitos de más de 5% o Coombs positivo. **Úlceras en piernas:** cuando son concomitantes a actividad clínica y en ausencia de trauma. **Pérdida fetal recurrente:** dos o más abortos espontáneos. **Oclusión arterial:** cuando afecta arterias nominadas o causa un infarto bien definido y de preferencia con comprobación arteriográfica, ultrasonográfica o gamagrafía. **Livedo reticularis:** cuando se determina por exploración física.

Grupo II) Se incluyeron sueros de sujetos clínicamente sanos (SCS), en igual número a los de el grupo I. Se obtuvieron de donadores altruistas en el banco de sangre de el INCICH.

II.- Almacenamiento de los sueros:

a - 40°C hasta su procesamiento.

III.- Detección de AFL:

Se detectaron en suero anticuerpos anticardiolipina clase IgG como se describió en la pag 19.

IV.- Inhibición de los sueros con micelas de cardiolipina.

Se realizó el mismo procedimiento que se describió en la página 28.

V.- Detección de anticuerpos organo-específicos:

1) Condiciones en que fueron probados los sueros:

Los 13 sueros de pacientes con SAFP fueron probados para ACL tanto

basales como inhibidos con micelas de cardioplipina. En estas condiciones se probaron el mismo día también para AOE por inmunofluorescencia indirecta.

Simultáneamente se probaron los 13 sueros de sujetos clínicamente sanos sometiendo los a las mismas maniobras.

2) Se efectuó la determinación de anticuerpos órgano-específicos como se describió en la página 26. La lectura de las laminillas se realizó por dos observadores independientes (ANZ, PARL), bajo una clave preparada por un tercero. En los casos en desacuerdo se decidió por consenso el mismo día.

Se buscaron intencionadamente los patrones de fluorescencia que sugieren: anticuerpos antinucleares, antimitocondriales, antisarcolema y miofibrilar, antimúsculo estriado, unión dermoepidérmica, substancia intercelular, antimúsculo liso, contra células parietales, antitiroglobulina y antimicrosomales. Se buscó sistemáticamente fluorescencia en componentes nucleares y citoplásmicos. De esta forma se determinaron

a) fluorescencia identificable con patrones de autoanticuerpos específicos (los descritos). b) fluorescencia no identificable con patrón específico pero que mostrara consistencia en su aparición (demostrable en más del 50% del tejido y sin aspecto cristalóide al movimiento de enfoque micrométrico) y se decidió clasificar por topografía: citoplásmica y perinuclear.

VI.- Cálculo del tamaño de la muestra y tratamiento estadístico.

Para la estimación de prevalencia de anticuerpos órgano-

específicos en pacientes con SAFP a un nivel alfa de 0.05, prevalencia de 0.20 y tolerancia de 0.15 en base a datos de la literatura (62,63) utilizamos la fórmula $n = Z\alpha^2(PQ)/T^2$ obteniendo $n = 27$.

La descripción de los datos se hará con proporciones, promedio aritmético, desviación estándar. La estadística inferencial será con prueba t de Student para muestras independientes y pareadas, prueba de Wilcoxon, análisis de varianza paramétrico y no paramétrico. Se aplicará ajuste para comparaciones múltiples con el procedimiento de Bonferroni (64).

RESULTADOS

Se incluyeron 18 pacientes con SAFP de acuerdo a los criterios mencionados con anterioridad, sus características demográficas se consignan en la tabla 7 y las clínicas en la tabla 8.

Tabla 7. Características demográficas de los pacientes con síndrome antifosfolípido.

	Incluidos	Eliminados	Serie final
No. Casos:	18	5	13
Edad (años)			
Promedio:	31	32	31
Mediana:	30	33	30
Min-Max:	19-48	19-46	20-48
Sexo			
Fem/Masc	15/3	5/0	10/3
Tiempo de evolución (años)			
Promedio:	10	10	10
Mediana:	10	10	8
Min-Max:	1-26	5-13	1-26

Se eliminaron 5 casos (28%) todos de sexo femenino, sus características demográficas y clínicas se consignan en las tablas 7 y 8 respectivamente; las causas de eliminación fueron

Tabla 8.- Frecuencia de manifestaciones en 18 pacientes incluidos en el grupo de síndrome antifosfolípido primario.

CASO	EDAD años	SEXO	EVOL años	N	TV	TCP	AH	PFR	UP	OA	LR	MT	TEP
1	32	F	7	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
2	34	F	5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
3	28	F	5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
4	39	F	10	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
5	30	F	8	+	-	+	-	NE	-	-	-	-	-
6	33	F	13	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
7	46	F	12	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
8	26	F	9	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
9	19	F	5	+	-	-	-	NE	+	-	+	-	-
10	20	F	1	+	+	+	-	NE	-	-	-	-	+
11	48	M	26	-	+	+	-	NA	+	+	-	-	+
12	30	M	12	+	+	+	-	NA	+	+	+	-	-
13	20	F	3	-	+	+	-	NE	-	+	-	-	+
14	28	M	15	-	+	+	-	NA	-	+	-	-	+
15	39	F	25	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
16	30	F	9	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
17	37	F	6	+	-	+	+	NE	-	-	-	-	+
18	30	F	5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

N=NEUROLÓGICO, TV=TROMBOSIS VENOSA, TCP=TROMBOCITOPENIA AH=ANEMIA HEMOLITICA, PFR=PERDIDA FETAL REPETIDA, UP=ULCERAS EN PIERNAS, OA=OCCLUSION ARTERIAL, LR=LIVEDO RETICULARIS, MT=MIELITIS TRANSVERSA HF=HIPERTENSION PULMONAR, NE=NO EXPUESTO, NA=NOAPLICABLE

lupus eritematoso generalizado, muestra inapropiada de suero y negativización "in vivo" del ACL (tabla 9).

Los 13 casos restantes formaron la serie final y sus características demográficas se muestran en la tabla 7 y las clínicas en la tabla 8.

TABLA 9. Características de 5 pacientes eliminados del grupo inicial de síndrome antifosfolípido.

Caso	Edad	Sexo	Causa de eliminación	Laboratorio	Dx. final
4	39	F	Otra ERG	AAN Anular	LEG
6	33	F	Suero inactivado		SAFP
7	46	F	Suero inactivado		SAFP
8	26	F	Otra enfermedad	AAN Anular BAAR (+)	LEG/TB
9	19	F	Negativización in vivo	ACL (-)	SAFP

ERG= Enfermedad reumática generalizada
 LEG= Lupus eritematoso generalizado
 AAN= Anticuerpos antinucleares
 TB= Tuberculosis
 BAAR= Bacilos ácido alcohol resistentes
 ACL= Anticuerpos anticardiolipina
 SAFP= Síndrome antifosfolípido primario.

Puede apreciarse (tabla 7) que el grupo final no tiene diferencias significativas en cuanto a la edad y tiempo de evolución al compararlo con el grupo inicial. El grupo eliminado fueron pacientes de sexo femenino unicamente y en cuanto al tiempo de evolución considerado por medidas de tendencia central y el valor mínimo no muestra diferencias con los otros grupos, unicamente el valor máximo (13 años) difiere considerablemente del encontrado en el grupo inicial (26 años) y en el grupo final (26 años).

Resultados de la inhibición de los sueros con micelas de cardioliipina.

Los respectivos títulos de ACL se consideraron apropiados, confirmando que todas las muestras incluidas de pacientes con SAFP realmente tenían ACL en niveles de positividad al momento de efectuar los estudios laboratoriales.

Las inhibiciones de los 13 sueros de SAFP se consideraron exitosas, fluctuando entre el 73 y el 93% del valor basal (tabla 10).

En tres de los casos, aunque se lograron inhibiciones importantes (del 72 al 90%), los títulos permanecieron en niveles de positividad limitrofe respecto al punto de corte.

TABLA 10. Inhibición con micelas de cardiolíplina de 13 sueros de pacientes con síndrome antifosfolípido primario.

Número en El ensayo	Número del caso	D.O. Basal	D.O. Inhibido	Porcentaje de Inhibición
1	1	0.797	0.143	82
2	2	1.273	0.088	93
3	3	2.056	0.177	91
4	5	2.030	0.563	72
5	10	0.445	0.089	80
6	11	1.083	0.183	83
7	12	1.054	0.180	83
8	13	1.323	0.139	89
9	14	2.591	0.260	90
10	15	1.427	0.112	92
11	16	0.717	0.193	73
12	17	0.462	0.076	83
13	18	1.999	0.339	83

Resultados de la detección de AOE:

En este procedimiento las observaciones tuvieron concordancia aceptable, obteniéndose Kappa de +0.91.

Los resultados obtenidos al considerar los grupos totales muestran una mayor frecuencia de positividad para por lo menos uno de los anticuerpos séricos órgano-específicos en los pacientes con

SAFP (11 de 13) que en los sujetos clínicamente sanos (4 de 13).

TABLA 11. Frecuencia de anticuerpos órgano-específicos en sueros de 13 pacientes con síndrome antifosfolípido primario y 13 sujetos clínicamente sanos.

	Suero basal		Suero Inhibido	
	SAFP	SCS	SAFP	SCS
Anticuerpo:				
antinúcleo	0	0	0	0
antimitocondrial	0	0	0	0
anticorazón	6	0	1	1
antimúsculo estriado	8	0	1	0
antiunión dermoepidérmica	0	0	0	0
substancia intercelular epitelial	2	0	0	0
antimúsculo liso	3	0	0	0
anticélulas parietales	4	2	0	2
antitiroglobulina	8	1	3	0
antimicrosomales	5	1	4	1

SAFP= Síndrome antifosfolípido primario SCS= Sujetos clínicamente sanos.

Sin embargo al observar individualmente cada tipo de anticuerpo (tabla 11), hay tendencia a que esta mayor frecuencia sea debida a los anticuerpos contra corazón, tiroides y células

parietales, aunque estos últimos se presentaron también en 2 de los sueros de SCS.

En ninguno de los pacientes en que resultaron positivos estos anticuerpos se consignó evidencia clínica sugerente de enfermedad órgano-específica a juicio de los médicos tratantes.

La metodología empleada permitió la búsqueda de anticuerpos contra componentes de músculo estriado en 2 de los tejidos empleados como antígenos, lengua y corazón (tabla 12).

Tabla 12. Fluorescencia patrón miofibrilar en sueros de 13 pacientes con síndrome antifosfolípido primario (SAFP) y 13 sujetos clínicamente sanos (SCS) utilizando lengua y corazón de rata como antígenos.

		Sueros Basales		Sueros Inhibidos	
		Corazón		Corazón	
		(+)	(-)	(+)	(-)
SAFP					
	(+)	2	5	0	1
Lengua	(-)	3	3	0	12
SCS					
	(+)	0	0	0	0
Lengua	(-)	0	13	0	13

Así, 6 de los sueros de SAFP fueron positivos en corazón y 8 en lengua, en la tabla de contingencia (tabla 12) observamos que 3 sueros de SAFP fueron positivos en corazón con patrón miofibrilar pero negativos en lengua. Al probar los sueros inhibidos, destaca la negativización de 5 de los 6 sueros de SAFP con anticuerpo anticorazón, 5 de los 8 con anticuerpo antitiroglobulina, 7 de los

8 reactivos con músculo estriado de la lengua y 4 de los 4 reactivos con células parietales.

Los resultados de la búsqueda de fluorescencia inespecífica se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Frecuencia de fluorescencia inespecífica en sueros de 13 pacientes con síndrome antifosfolípido primario (SAFP) y 13 sujetos clínicamente sanos (SCS) utilizando órganos de rata como antígenos.

	Hígado	Corazón	Riñón	Lengua	Estómago
SAFP					
Citoplásmica	0/0	0/0	5/1	0/0	5/2
Perinuclear	0/0	0/0	2/1	0/0	0/0
SCS					
Citoplásmica	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Perinuclear	1/1	0/0	1/1	0/0	1/1

* Valor en sueros basales / Valor en sueros inhibidos NA= No aplicable

Los sueros de SCS mostraron patrón citoplásmico en células de mucosa gástrica solo en un caso y patrón perinuclear en hígado, riñón y estómago con un caso cada uno. Los sueros de pacientes con SAFP mostraron patrón citoplásmico en riñón (5/13) y estómago (5/13), llama la atención que al inhibir los sueros se negativizan 4 de los 5 positivos en riñón y 3 de los 5 positivos en estómago. Solo en dos casos, ambos en riñón, se observó patrón perinuclear.

DISCUSION.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes con SAFP del grupo inicial (n=18) no parecen haber sufrido modificaciones radicales por la eliminación de 5 de ellos. De hecho, al comparar estas características con las del grupo final (n=13) no hay diferencias relevantes en esas variables. Cabe hacer mención que el grupo final representa aproximadamente el 50% del tamaño de la muestra requerida para este estudio, sin embargo es un grupo valioso tratándose de una enfermedad poco común como el SAFP.

De los 5 pacientes eliminados del estudio, en 2 la causa fue problema logístico en el almacenamiento de los sueros, ya que habían sido inactivados por calor; en estos casos el diagnóstico permaneció sin modificaciones. Así, en realidad fueron 3 los casos en que la eliminación ocurrió por modificación de la impresión diagnóstica (tabla 9).

La determinación de anticuerpos antifosfolípido por métodos diferentes a ELISA se efectuó con VDRL y si era positivo confirmación con FTA. El anticoagulante lúpico no se consideró, ya que una proporción de los casos recibían terapia anticoagulante.

La frecuencia claramente mayor de anticuerpos contra tejido cardíaco y tejido tiroideo en los pacientes con SAFP respecto a los SCS (tabla 11) muestra que los hallazgos inmunoserológicos en dicha enfermedad van más allá de la expresión "aislada" de anticuerpos antifosfolípido detectables por alguno de los métodos aceptados como estándar y de la ausencia de marcadores serológicos relativamente "específicos" (vgr: anticuerpos antinucleares con

especificidad para DNA nativo) de enfermedades autoinmunes generalizadas (20,21,65). La presencia de esta clase de autoanticuerpos órgano-específicos plantea varias interrogantes.

1) Inicialmente es conveniente conocer si estos autoanticuerpos son independientes de la manifestación inmunoserológica conspicua en esta enfermedad, los anticuerpos antifosfolípido. Al respecto, encontramos que de los 6 sueros de SAFP positivos para anticuerpos anticorazón (tabla 11), 5 tuvieron patrón miofibrilar y de ellos, 3 fueron negativos en lengua (músculo estriado) (tabla 12), lo que en estudios en otro contexto se ha interpretado como anticuerpos asociados más específicamente con enfermedad miocárdica (66,67). La negativización de 5 (incluyendo los 3 positivos más "específicos") de estos 6 sueros con anticuerpos anticorazón al inhibirlos con micelas de cardiolipina, si bien no prueba que es el mismo anticuerpo anticardiolipina detectado, si permite abandonar el nivel de especulación y establecer el de asociación entre ambos fenómenos.

En cuanto a los anticuerpos antitiroideos, la mayor frecuencia (11/13) es condicionada por ambos tipos, aunque los antitiroglobulina son positivos en mayor número de casos (8/13) que los antimicrosomales (5/13). Los resultados de las pruebas de inhibición muestran dos patrones de comportamiento, de los antitiroglobulina se negativizaron 5/8 y de los antimicrosomales 1/5. La tendencia parece clara, los anticuerpos antimicrosomales predominantemente son independientes del anticuerpo anticardiolipina presente en estos pacientes; los anticuerpos

antitiroglobulina por lo menos un 50% de ellos estan asociados al anticuerpo anticardiopina o tal vez sean el mismo. Como se mencionó en la introducción hay reportes escasos y generalmente anecdóticos de estos aspectos (16,21). Por lo tanto aunque no es equivalente, es interesante un estudio reciente de Pratt y colaboradores (68) en que estudiaron la frecuencia de anticuerpos antitiroideos en un grupo de mujeres con embarazo y antecedentes de abortos o pérdidas fetales, encontrando positividad en 14 de 45 (31%) pacientes contra 19 de 100 (19%) en los controles sanos, no se describe asociación con anticuerpos anticardiopina.

2) El significado de estos autoanticuerpos órgano-específicos en pacientes con SAFP deberá dilucidarse. En especial debe considerarse su participación potencial al estimar asociaciones entre AFL y manifestaciones de los órganos involucrados, por ej: corazón. Así, el concepto de que el SAFP "proporciona un modelo para evaluar el papel clínico de los AFL ya que cuando estos anticuerpos se encuentran asociados a enfermedades como LES es difícil discriminar con los otros autoanticuerpos presentes" (65) debe reconsiderarse.

Podría tratarse de reactividad del mismo ACL con fosfolípidos, celulares o de epifenómeno en el contexto de enfermedad autoinmune aunque antes debe evaluarse su potencial patogénico.

CONCLUSIONES

I.- La prevalencia encontrada en este estudio de AOE positivos en pacientes con SAFP y títulos séricos altos de ACL, de (11 de 13), comparada contra la de los sujetos clínicamente sanos de (4 de 13), es evidencia de que los pacientes con SAFP tienen AOE con mayor frecuencia que la población de referencia. Esta mayor frecuencia, en este estudio, la condicionan específicamente los anticuerpos contra corazón, tiroides, y en menor grado contra células parietales.

II.- El fenómeno de negativización para la detección de AOE al adsorber los sueros de pacientes con SAFP con micelas de cardiolipina, es evidencia de que, por lo menos en algunos casos, los ACL y AOE están asociados y quizá sean el mismo anticuerpo.

III.- La investigación de reacciones antígeno-anticuerpo específicas para diversos órganos ha mostrado asociaciones con enfermedad clínica. Ha sido preocupación constante en las descripciones clásicas de esta metodología (57), el preservar los determinantes antigénicos proteícos en células y tejidos. En nuestro trabajo se decidió estudiar además otros epitopes de naturaleza química distinta, fosfolípidos, que pueden encontrarse como entidades químicas discretas en las membranas celulares. Por tal razón, fue indispensable, y se logró, establecer métodos que aseguran la persistencia de estos epitopes y abren un campo novedoso a la investigación de enfermedades órgano específicas.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Cronin ME, Biswas RM, Straeton C, et al: IgG and IgM anticardiolipin antibodies in patients with lupus with anticardiolipin antibodies associated clinical syndromes. *J Rheumatol* 1988;75: 795-8.
- 2.- Bowie EJ, Thompson JH, Pascuzzi CA, et al: thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med* 1963;62: 416-30.
- 3.- Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ: peripheral vascular syndromes associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Int Med* 1965;62: 907-19.
- 4.- Feinstein DI, Rappaport SI: Acquired inhibitors of blood coagulation in five patients. In: Spaet TH, ed. *Progress in Haemostasis and Thrombosis*, Vol 1, New York: Grune and Stratton, 1972: 75-95.
- 5.- Boey HL, Colaco CG, Gharavi AE, et al: Thrombosis in systemic lupus erythematosus: Striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J* 1983;287: 1021-3.
- 6.- Harris EM, Gharavi AE, Boey ML, et al: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2: 1211-4.
- 7.- Sammaritano LR, Gharavi AE, Lockshin MD.: Antiphospholipid Antibody Syndrome: Immunologic and Clinical Aspects. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20(2):81-96.
- 8.- Levine SR, Welch KMA. Antiphospholipid Antibodies. *Annals of Neurology* 1989; 26:386-389.
- 9.- Unander AM, Norberg R, Hahn L, et al: Anticardiolipin Antibodies and complement in ninety-nine women with habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:114-119.
- 10.- Barbui T, Radici E, Cortelazzo S, et al: Antiphospholipid antibodies in early repeated abortions: a case controlled study. *Fertil Steril* 1988;50:589-592.
- 11.- Koskela P, Vaarala O, Makitalo R, et al: Significance of false positive syphilis reactions and anticardiolipin antibodies in a nationwide series of pregnant women. *J Rheumatol* 1988;15:70-73.
- 12.- Khamashta MA, et al: Association of antibodies against phospholipids with heart valve disease in systemic lupus

- erythematosus. Lancet 1990;335:1541-44.
- 13.- Carette S, Jobin F: Acute adrenal insufficiency as a manifestation of the anticardiolipin syndrome ?. Case report. Ann Rheum Dis 1989;48: 430-1.
 - 14.- Lenaerts J, Vanneste D, Knockaert D, Arnout J, Vermylen J.: SLE and acute Addisonian crisis due to bilateral adrenal hemorrhage: association with the antiphospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol 1991;9:407-409.
 - 15.- Walz B, Ho Ping Kong H, Silver R: Adrenal failure and the Primary Antiphospholipid Syndrome. Case Report. J Rheumatol 1990;17: 836-7.
 - 16.- Alarcón-Segovia D: Trombocitopenia y enfermedad tiroidea. Posible relación con anticuerpos antifosfolípidos. Rev Invest Clin 1988;40: 113.
 - 17.- Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, et al: Antiphospholipid Antibodies and the Antiphospholipid Syndrome in Systemic Lupus Erythematosus. A prospective study of 500 consecutive patients. Medicine 1989;68,6:353-65.
 - 18.- Perez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J, Alarcon-Segovia D. : Influence of disease duration, continued followup and further antiphospholipid testing on the frequency and classification category of antiphospholipid syndrome in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1993;20:437-42.
 - 19.- Alarcon-Segovia D, Perez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J.: Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 1992;21,5:275-286.
 - 20.- Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J: Primary antiphospholipid syndrome. J Rheumatol 1989;16:482-8.
 - 21.- Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The "Primary Antiphospholipid Syndrome: Major Clinical and Serological Features. Medicine 1989;68,6:366-374.
 - 22.- McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krillis SA,: Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoproteina H). Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:4120-4.
 - 23.- Galli M, Comfurius P, Massen C, Hemker HC, De Baets MH, Van

Breda-Vriesman PJC, Barbui T, Zwaal FFA, Bevers EM:
Anticardiolipin Antibodies (ACA) directed not to cardiolipin
but to plasma protein cofactor. Lancet 1990;335:1544-7.

- 24.- Shoenfeld Y, Meroni PL. The beta-2-glycoprotein I and antiphospholipid antibodies. Clin Exp Rheumatol 1992;10:205-209
- 25.- Janoff AS, Rauch J: The epitopic specificity of lupus anticoagulants. Meeting of the subcommittee on Standardization of Lupus Anticoagulant, XIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 30-July 6, Amsterdam, The Netherlands.
- 26.- Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, et al: Affinity purified anticardiolipin and anti-DNA antibodies. J Clin Lab Immunol 1985;17: 155-62.
- 27.- Eilat D, Zlotnick AY, Fischel R: Evaluation of the cross reaction between anti-DNA and anticardiolipin antibodies in SLE and experimental animals. Clin Exp Immunol 1986;65:269-278.
- 28.- Smeenk RJT, Lucassen WAM, Swaak TJG: Is anticardiolipin activity a cross reaction of anti-DNA or a separate entity? Arthritis Rheum 1987;30:607-617.
- 29.- Mackworth-Young CG, Chan J, Harris EN, et al: High incidence of anticardiolipin antibodies in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1987;14:723-726.
- 30.- Savi M, Ferraccioli GF, Neri TM, et al: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in Northern Italian systemic lupus erythematosus patients. Arthritis Rheum 1988;31:1568-1570.
- 31.- Wilson WA, Perez MC, Michalski JP, et al: Cardiolipin antibodies and null alleles of C4 in black Americans with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1988;15:1768-1772.
- 32.- McHugh NJ, Maddison PJ: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus (letter). Arthritis Rheum 1989;32:1623-24)
- 33.- McNeil HP, Gavaghan TP, Krilis SA, Geczy AF, Chesterman CN: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies. Clin Exp Rheumatol 1990;8:425-2
- 34.- Goldstein B, Smith CD, Sengar DPS: MHC class II studies of primary antiphospholipid syndrome and of serum antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus (abstract). Arthritis Rheum 1990;33(suppl 9):S125.

ESTA TESIS NO DEBE
S-LIR DE LA BIBLIOTECA

- 35.- Arnett FC, Olsen ML, Anderson KL, Reveille JD: Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with the lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1991;87:1490-1495.
- 36.- Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, Khamashta MA, Hughes GRV: Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. (Concise communication) *Arthritis Rheum* 1992;35,1:124-125.
- 37.- Granados J, Vargas G, Bekker C, Alarcón-Segovia D. Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients. Fifth International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. September 1992; Abstract S-19).
- 38.- Handin RI. Bleeding and thrombosis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. Mc Graw Hill. 1991:348-353.
- 39.- Moncada S, Vane JR. Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. *Br Med Bull* 1978;34:129-35)
- 40.- Alarcón-Segovia D: pathogenetic potential of antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1988;15: 890-3.
- 41.- Watson KV, Schorer AE. Lupus anticoagulant inhibition of in vitro prostacyclin release is associated with a thrombosis-prone subset of patients. *Am J Med* 1991;90:47-53)
- 42.- Greaves M, Lindsay N, Malia RG, Henderson F, Hughes P. Inhibition of thrombin-induced prostacyclin release by sera containing antiphospholipid antibodies is masked by products of platelet activation. *Thromb Haemostas* 1991;65:1257 (abs).
- 43.- Lellocuche F, Martinuzzo M, Said P, Maclouf J, Carreras LO. Imbalance of thromboxane/prostacyclin biosynthesis in patients with lupus anticoagulant. *Blood* 1991;78:2894-2899)
- 44.- Cariou R, Tobelem G, Bellucci S, et al: Effect of lupus anticoagulant on antithrombogenic properties of endothelial cells. Inhibition of Thrombomodulin dependent protein C activation. *Thromb Haemostasis* 1988;60:54-58.
- 45.- Cariou R, Tobelem G, Soria C, et al: Inhibition of protein C activation by endothelial cells in the presence of lupus anticoagulant. *N Engl J Med* 1986;314:1193-1194.
- 46.- Cines DB, Lyss AP, Reeber M, et al: Presence of complement-fixing antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1984;73:611-625.

- 47.- Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, et al: Measurement and characterization of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. Clin Exp Immunol 1988;72:450-456.
- 48.- Vismara A, Meroni PL, Tincani A, et al: Relationship between anti-cardiolipin and anti-endothelial cells antibodies in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 1988;74:247-253.
- 49.- LeRoux G, Wautier MP, Guillevin L, et al: IgG binding to endothelial cells in systemic lupus erythematosus. Thromb Haemostasis 1986;56:144-146.
- 50.- Khamashta MA, Harris EN, Gharavi AE, et al: Immune mediated mechanism for thrombosis: antiphospholipid antibody binding to platelet membranes. Ann Rheum Dis 1988;47:849-854.
- 51.- Rauch J, Meng QH, Tannenbaum H: Lupus anticoagulant and antiplatelet properties of human hybridoma antibodies. J Immunol 1987;139:2598-2604.
- 52.- Misra R, Venables PJW, Plater-Zyberk C, et al: Anticardiolipin antibodies in infectious mononucleosis react with the membrane of activated lymphocytes. Clin Exp Immunol 1989;75:35-40.
- 53.- Devaux PF: Static and Dynamic lipid assymetry in cell membranes. Biochemistry 1991;30,5:1163-73.
- 54.- Hasselaar P, Derksen R, Blokzijl L, de Groot P: Crossreactivity of antibodies directed against cardiolipin, DNA, endothelial cells and blood platelets. Thrombosis and Haemostasis 1990;63,2:169-73.
- 55.- Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV: Anticardiolipin antibodies: Isotype distribution and phospholipid specificity. Ann Rheum Dis 1987;46: 1-6.
- 56.- Nava A, Bañales JL, Reyes PA: Effect of Heat Inactivation and Sheep Erythrocyte Adsorption on the Titer of Anticardiolipin Antibodies in Primary Antiphospholipid Syndrome and Healthy Blood Donors' Sera. J Clin Lab Anal 1992;6:148-59.
- 57.- Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal and neurological antigens. Manual of clinical immunology, NR Rose Fredman. American Society for Microbiology, Detroit Michigan, 1986; 762-70.
- 58.- Cheng HM, Ngeow YF, Sam CK: Heat inactivation of serum potentiates anticardiolipin antibodies binding in ELISA. J Immunol Methods 1989;124: 235-8.

- 59.- Nava A., Bañales J.L., Reyes P.A.: Heat inactivation of bovine serum used for blockade in immunoenzymatic assay is associated with spurious fall on the titers of anticardiolipin antibodies in primary antiphospholipid syndrome sera. *J Clin Lab Analysis* 7:116-118, 1993
- 60.- Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS: Distinguishing Plasma Lupus Anticoagulants from Anti-factor Antibodies Using Hexagonal (II) Phase Phospholipids. *Thromb Haemostas* 1989;62,3: 892-6.
- 61.- Cabral AR, Cabiedes J and Alarcón-Segovia D. Haemolytic anemia related to an IgM autoantibody to phosphatidylcholine that binds in vitro to stored and to bromelain-treated human erythrocytes. *J Autoimmunity* 1990;3:773-87.
- 62.- Kunkel HG: The immunological approach to SLE. *Arthritis Rheum* 1977;20: S139.
- 63.- Asherson RA. A "Primary" Antiphospholipid Syndrome?. (Ed). *J Rheumatol* 1988;15,12:1742-1746.
- 64.- Stolley PD, Strom BL: sample size calculations for clinical pharmacology studies. *Clin Pharm Ther* 1986;490.
- 65.- Galve E, Ordi J, Barquinero J, Evangelista A, Vilardell M, Soler-Soler J. Valvular Heart Disease in the Primary Antiphospholipid Syndrome. *Ann Int Med* 1992;116:293-298.
- 66.- Caforio ALP, Wagner R, Gill J, et al. Organ-specific cardiac antibodies: serological markers for systemic hypertension in autoimmune polyendocrinopathy. *Lancet* 1991;337:1111-1115.
- 67.- Caforio ALP, Bonifacio E, Dewart JT, et al. Novel organ-specific circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *JACC* 1990;15:1527-34.
- 68.- Pratt D, Novotny M, Kaberlein G, Dudkiewicz A, Gleicher N. Antithyroid antibodies and the association with non-organ-specific antibodies in recurrent pregnancy loss. *Am J Obst Gynecol* 1993;168:837-841)