

11202  
Z  
zej

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Tesis para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Médicas.

**INTERACCIONES ENTRE FOSFOLIPIDOS ANIONICOS,  $\beta$ 2 GLICOPROTEINA I  
Y ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO EN LA MEMBRANA PLAQUETARIA.**

Departamento de Inmunología y Reumatología.

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Alumna: No<sup>a</sup> Janitzia Vázquez Mellado Cervantes.

Tutor: Dr. Donato Alarcón-Segovia.

Cotutor: Dr. Luis Llorente Peters.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1996



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## Abreviaturas

A23187	Ionóforo de calcio
a $\beta$ 2GPI	Anticuerpos anti- $\beta$ 2 glicoproteína I
aCL	Anticuerpos anti-cardiolipina
ACM	Anticuerpos monoclonales
aFL	Anticuerpos antifosfolípido
aFTS	Anticuerpos anti-fosfatidilserina
aGMP140	Anticuerpos anti-GMP140
$\beta$ 2GPI	$\beta$ 2 glicoproteína I
CL	Cardiolipina
DNAdc	DNA de doble cadena
DO	Densidades ópticas
EDTA	Etilendiaminotetracetato de Na
ELISA	Análisis inmunoenzimático
EM	Esfingomielina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLs	Fosfolípidos
FTC	Fosfatidilcolina
FTE	Fosfatidiletanolamina
FTS	Fosfatidilserina
GMP140	CD62 o GMP140
HAT	Hipoxantina, aminopterina, timidina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEG	Lupus eritematoso generalizado
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PE	Ficoeritrina
SAF	Síndrome antifosfolípido
SAFP	Síndrome antifosfolípido primario
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

# I N D I C E

	Página
I. Introducción	1
II. Objetivos	7
III. Hipótesis	7
IV. Sujetos	8
V. Material y métodos	9
a) Diseño	9
b) Material Reactivos Equipo	9
VI. Análisis estadístico	17
VII. Financiamiento	17
VIII. Resultados	18
IX. Discusión	30
Anexo I	38
Referencias	41

## I. INTRODUCCION

### A) Anticuerpos antifosfolípido.

Los anticuerpos antifosfolípido (aFL) son un grupo heterogéneo de anticuerpos. Actualmente, se dice que una persona tiene aFL en suero si cursa con VDRL falso positivo, anticoagulante lúpico y/o anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) detectados por el método de ELISA <sup>4,5,6,47,50,59,60,82,94,102,128</sup>.

Los aFL se pueden encontrar positivos en diversas enfermedades infecciosas <sup>18,30,33,34,35,56,65,95,129</sup>, linfoproliferativas <sup>28,31</sup>, asociados al uso de algunos medicamentos como clorpromazina <sup>24,25</sup> y en ancianos sanos <sup>86</sup>; sin embargo, en todas estas circunstancias los títulos de aFL no suelen ser muy altos, los períodos de positividad no son prolongados y tienden a ser mas importantes las elevaciones de aFL IgM que de IgG <sup>81,83,85</sup>.

Los aFL se han encontrado también hasta en el 53.2% de los pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) <sup>1,2,6,8,41,48,54,55,94</sup> en los que, la presencia de dichos anticuerpos se asocia a diversas manifestaciones clínicas, de las cuales las más frecuentes son: Trombosis venosas de repetición, oclusiones arteriales, trombocitopenia, pérdida fetal recurrente, livedo reticularis y anemia hemolítica <sup>1,2,8</sup>. Se considera Síndrome antifosfolípido definido (SAF) a la presencia de dos o mas de las manifestaciones clínicas asociadas y aFL en suero a títulos altos, cuando dicho síndrome se presenta en pacientes con LEG se habla de SAF secundario a LEG <sup>1,2,6,15,41,48,54,55,59,60,86</sup>, cuando se presenta en un paciente sin evidencia clínica de LEG se habla de un SAF primario (SAFP) <sup>3</sup>.

Los aFL de los pacientes con enfermedades autoinmunes (LEG y SAF) son diferentes a los aFL que se presentan en otras entidades no autoinmunes, la mejor estudiada de éstas es sífilis <sup>33,34,35,81</sup>. Los aFL de pacientes con enfermedades autoinmunes se caracterizan por reaccionar intensamente con fosfolípidos aniónicos (cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico) y en general, tienen menor reactividad

con fosfolípidos neutros (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina)<sup>41,54,56,94</sup>. Estos anticuerpos requieren la presencia de  $\beta$ 2 glicoproteína I ( $\beta$ 2 GPI) para su detección en el ensayo de ELISA<sup>10,44,61,72,77,87,91,92,100,115,131</sup> y múltiples trabajos realizados han concluido que éstos reaccionan con el complejo  $\beta$ 2GPI-fosfolípidos aniónicos; a diferencia de lo anterior, los aFL que se encuentran en sífilis reaccionan con fosfolípidos en general, tanto aniónicos como neutros<sup>4,61</sup> y no requieren de la  $\beta$ 2 GPI para su detección, incluso si se agrega  $\beta$ 2 GPI al ensayo puede disminuir la reactividad de los aFL con fosfolípidos tal vez por competencia. Por todo lo anterior, los aFL de los pacientes con sífilis serían realmente aFL y los de los pacientes con enfermedades autoinmunes serían anticuerpos contra fosfolípidos- $\beta$ 2 GPI<sup>10,21,44,46,91,92,97,108</sup>. Los aFL son pues, una familia heterogénea de anticuerpos los cuales pueden clasificarse de acuerdo a los fosfolípidos con los que reaccionan (negativos o neutros), el tipo de ensayo en el que se detectan (aCL, anticoagulante lúpico, VDRL), el isotipo (IgG y/o IgM), el requerimiento o no de cofactores ( $\beta$ 2GPI, protrombina o cininógeno) y las condiciones asociadas (LEG, SAFP, o infección)<sup>4,13,44,61,72,77,93,123,131</sup>.

Los pacientes con sífilis y otras enfermedades infecciosas, a pesar de tener títulos altos de aFL no cursan con las manifestaciones clínicas que se asocian a aFL en los pacientes con enfermedades autoinmunes, por tanto, se ha postulado que las diferencias en los aFL entre dichas entidades podría ser un punto determinante en explicar la presencia de manifestaciones clínicas en unos y ausencia en otros<sup>9,16,17,26,61,81,100</sup>.

### **B) $\beta$ 2 glicoproteína I.**

En 1990 se postuló por primera vez la importancia de la  $\beta$ 2GPI para la reactividad de los anticuerpos antifosfolípido<sup>44,92</sup> in vitro. Dos grupos en forma simultánea reportaron que los aFL purificados reaccionaban con fosfolípidos de carga negativa en presencia de  $\beta$ 2GPI, pero no tenían reactividad con fosfolípidos aniónicos únicamente o con  $\beta$ 2GPI por sí sola en el ensayo de ELISA. Esto ha sugerido 3 posibilidades: Que los aFL reconocen un epítotope formado por  $\beta$ 2GPI y fosfolípidos, reconocen a un neoepítotope en la  $\beta$ 2GPI modificada posterior a su unión con fosfolípidos aniónicos o tienen reactividad con los fosfolípidos aniónicos siempre en presencia de  $\beta$ 2GPI (modelo acarreador-hapteno)

La  $\beta$ 2GPI también conocida como apolipoproteína H, es cofactor de anticuerpos aFL y probablemente corresponde al que alguna vez se describió como inhibidor de proteína C<sup>74,79,106,120</sup>, es una glicoproteína plasmática descrita en 1961 por Schultze y cristalizada en 1966 por Haupt<sup>120</sup>. Tiene un peso molecular de 70 kD en condiciones de reducción y 48-52 kD no reducida; está formada por una sola cadena de 326 aminoácidos, es rica en cisteína y prolina<sup>79,84,120</sup>, su glicosilación es variable y se caracteriza por tener microheterogeneidad de ácido siálico además de polimorfismo de asialoglicoproteínas<sup>(117)</sup>. La  $\beta$ 2GPI tratada con bromuro de cianógeno da como resultado 5 fragmentos: El primero, el cual es el extremo aminoterminal, comprende los aminoácidos 1-40; el segundo (aminoácidos 43-72), tercero (aminoácidos 162-193) y cuarto (aminoácidos 239-268) son los fragmentos en los que se encuentran los sitios de glicosilación y el quinto (aminoácidos 272-308) es el extremo carboxiterminal.

La  $\beta$ 2GPI humana tiene 84% de homología con la proteína de la rata y 82.5% de la bovina, se sintetiza en el hígado como un precursor de 345 aminoácidos, hasta el momento no ha sido posible mostrar su síntesis en otros tejidos<sup>36</sup>.

La  $\beta$ 2GPI pertenece a una familia de proteínas llamadas proteínas con unidades repetitivas cortas (SCR), las cuales tienen entre 2 y 30 dominios llamados dominios sushi éstos pueden ser del mismo tipo o mosaicos y frecuentemente constan de 60 aminoácidos ricos en cisteínas. Entre las proteínas que se encuentran en esta familia destacan<sup>70,107</sup>:

Proteínas del complemento: FB, C1r, C1s, C2, C6, C7, C4bp, CR1, CR2.

Otros receptores y moléculas de adhesión: rIL2, GMP140, ELAM1.

Proteínas séricas: FXIII, haptoglobina  $\alpha$ 1,  $\beta$ 2GPI.

Otras: Proteína nuclear de proteoglicanos de cartílago, peroxidasa tiroidea, proteoglicanos de fibroblastos.

La  $\beta$ 2GPI consta de 5 dominios "sushi" con gran cantidad de secuencias repetitivas como es característico en estas proteínas. El quinto dominio, específicamente la unión entre los aminoácidos 314-315 y 317-318 parece ser determinante en la afinidad de la proteína por

FLs aniónicos y por tanto es responsable de su actividad de cofactor <sup>52,70,73,88</sup>.

La  $\beta$ 2GPI tienen gran afinidad por heparina, fosfocelulosa, deoxicolato, DNAdc, DNACs, mitocondrias, fosfolípidos aniónicos, membrana plaquetaria, lipoproteínas y triglicéridos; se ha propuesto que dicha afinidad sea debido a la carga negativa de varios de éstos compuestos o por interacción con los grupos fosfato <sup>74,79,106</sup>.

La proteína está codificada por alelos codominantes, se han descrito hasta la fecha cuatro alelos (APOH\*1, APOH\*2, APOH\*3 y APOH\*4) en estudios hechos en población blanca, negra y asiática el alelo más frecuentemente encontrado es el APOH\*2, el APOH\*4 únicamente se ha descrito en población negra <sup>68,121</sup>.

La  $\beta$ 2GPI se encuentra en concentraciones séricas de 15-30 mg/dl en el hombre, una parte de ella está en las lipoproteínas plasmáticas: 16-18% en HDL, 7-9% en VLDL, <2% en LDL, 16% en quilomicrones y 60-70% en el botón de densidad 1.21 <sup>29,38,79,105,106,121,135</sup>.

A través de isoelectroenfoque y otros estudios se ha mostrado que la proteína puede tener variaciones cualitativas determinadas genéticamente (subtipos o isoformas) o a nivel post-traduccionales (variaciones en la glicosilación); se han descrito también diferencias cuantitativas determinadas genéticamente (deficiencia de  $\beta$ 2GPI) y probablemente adquiridas o secundarias (hipertrigliceridemia asociada a deficiencia de  $\beta$ 2GPI), sin embargo no sabemos la importancia de estas variaciones ya que las diversas isoformas o diferencias en glicosilación no parecen alterar la función de la proteína y en ninguno de los casos la deficiencia de la proteína se ha asociado con manifestaciones clínicas.

Aunque no se conoce su función exacta, se ha propuesto que la  $\beta$ 2GPI sea un anticoagulante natural por su capacidad de: 1) inhibir la vía intrínseca de la coagulación: el sistema de contacto de la coagulación se activa al unirse el factor XII y la precalicreína a superficies con carga negativa, la  $\beta$ 2GPI se une a los compuestos aniónicos y de esa forma inhibe la cascada de la coagulación en una manera dependiente de la dosis, 2) guardar relación con la actividad de adenilato ciclasa de las plaquetas y, 3) inhibir la



actividad de protrombinasa de plaquetas activadas que da lugar a la formación de trombina <sup>98,116,118,119</sup>.

### **C) Membrana plaquetaria.**

Los fosfolípidos son constituyentes de las membranas celulares, éstos se encuentran en forma de bicapa con distribución asimétrica. En las plaquetas en reposo el 93% de la esfingomielina (EM) y el 45% de la fosfatidilcolina (FTC) se encuentran en la superficie externa y el 80% de fosfatidiletanolamina (FTE) y el 95% de la fosfatidilserina (FTS) en la superficie interna de la membrana plaquetaria <sup>11,12,14,58,134</sup>. El mantenimiento de esta distribución asimétrica es un proceso que requiere de sistemas de transporte específicos como la translocasa de aminofosfolípidos y su relación con el citoesqueleto <sup>32,43,124,127</sup>. Posterior a estímulos con diversos agonistas las plaquetas sufren el complejo proceso de activación plaquetaria (adhesión, agregación, liberación de sustancias) en el cual, a nivel de la membrana plaquetaria se han descrito varios cambios: 1) Entrada de calcio al citoplasma, 2) Pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana, a través de procesos de translocación que originan que la superficie externa de ésta se convierta en una superficie fundamentalmente de carga negativa dada por mayor expresión de fosfatidilserina y 3) Variaciones en la forma de las plaquetas, y formación de evaginaciones que posteriormente se liberan como microvesículas constituidas por una bicapa de fosfolípidos que en la superficie externa son de carga negativa <sup>7,11,12,14,27,32,69,71,126,136</sup>. Todo ello da lugar a que tanto la superficie de la membrana plaquetaria, como de las microvesículas se transformen en una superficie procoagulante. La exposición de FTS en la membrana de plaquetas activadas es crucial para la hemostasia debido a que ello es un evento indispensable para la activación del factor X (por el complejo factor IXa + factor VIIIa) y para la conversión de protrombina a trombina (por el complejo activador de protrombina).

La exposición de FTS parece ser también un evento clave al menos en eritrocitos, para su eliminación de la circulación al pasar por el bazo. En otras células como los linfocitos que sufren apoptosis, la expresión de FTS en la superficie da lugar al reconocimiento de éstas células por los macrófagos <sup>14</sup>.

#### **D) Anticuerpos antifosfolípido y plaquetas.**

Las manifestaciones clínicas más frecuentemente asociadas a aFL son trombocitopenia y eventos tromboticos, por lo que muchos trabajos han tratado de definir la interacción de aFL-membrana plaquetaria y endotelio. Esta interacción se ha evaluado desde dos puntos de vista: en el primero algunos autores <sup>63,103</sup>, han reportado que los aFL son capaces de activar a las plaquetas y favorecer su agregación; en el segundo se ha evaluado la unión de los aFL a plaquetas en reposo y activadas, la mayoría de los reportes están de acuerdo que los aFL no se unen a plaquetas en reposo (lo cual va en contra de su capacidad de activarlas) y sí lo hacen a plaquetas lisadas, sin embargo existía controversia respecto a su unión a plaquetas activadas, aparentemente tal controversia es debida a las variaciones en la metodología utilizada en los diferentes estudios: agonistas utilizados y dosis de los mismos, métodos para la obtención de plaquetas, métodos para valorar la activación plaquetaria, la utilización de aFL purificados o sueros aFL+ y la presencia o no de  $\beta$ 2GPI en los ensayos <sup>45,46,51,57,111,122</sup>.

#### **E) aFL- $\beta$ 2GPI-plaquetas.**

Schousboe <sup>119</sup> reportó que la  $\beta$ 2GPI tenían capacidad de unirse a plaquetas lavadas, aunque en su estudio no utilizó agonistas plaquetarios ni valoró el estado de activación de las mismas, es posible que la proteína se una a plaquetas activadas debido a la gran afinidad que tiene por superficies de carga negativa y que posteriormente los aFL sean capaces de interactuar con el complejo plaquetas- $\beta$ 2GPI.

Recientemente, se publicó un trabajo <sup>122</sup> en el cual obtienen aCL y anticuerpos con actividad de anticoagulante lúpico de pacientes con síndrome antifosfolípido los cuales marcaron con radioisotopos y evaluaron la unión de ambos a plaquetas en reposo y activadas. Los resultados muestran que los aCL requieren de la presencia de la  $\beta$ 2GPI para su unión a plaquetas y que ésta es mayor a plaquetas activadas. En este trabajo no evaluaron la unión de la  $\beta$ 2GPI per se a las plaquetas activadas, ni el estado de activación plaquetaria.

## II. OBJETIVOS

1. Determinar la capacidad de unión de la  $\beta$ 2GPI a plaquetas de sujetos sanos y pacientes con SAF en reposo y estimuladas con ionóforo de calcio A23187 y/o trombina.
2. Determinar si la unión de aFL purificados a plaquetas, guarda relación con la unión de  $\beta$ 2GPI a plaquetas.
3. Determinar la presencia de  $\beta$ 2GPI en la membrana plaquetaria ex vivo de sujetos sanos y de pacientes con SAF.

## III. HIPOTESIS

1. La  $\beta$ 2GPI se une preferentemente a plaquetas estimuladas con A23187 y/o trombina que a plaquetas en reposo.
2. Los aFL purificados, se unen preferentemente a plaquetas estimuladas con A23187 y trombina y que ésto guarda relación con la cantidad de  $\beta$ 2GPI adherida a la membrana.
3. Los pacientes con SAF tienen mayor cantidad de  $\beta$ 2GPI adherida a la membrana plaquetaria que los sujetos sanos.

#### IV. SUJETOS.

Se incluirán individuos sanos y pacientes con LEG y SAFP de acuerdo a las siguientes definiciones:

\* Lupus eritematoso generalizado con síndrome antifosfolípido asociado. De acuerdo a criterios propuestos por el Colegio Americano de Reumatología y los criterios propuestos para síndrome antifosfolípido asociado a LEG que son <sup>125</sup>: La presencia de dos o más de las manifestaciones clínicas reportadas como asociadas y títulos de aCL por arriba de 5 desviaciones estándar de la media de los sujetos sanos.

\* Síndrome antifosfolípido primario. Según los criterios anteriormente mencionados pero en ausencia de datos clínicos y de laboratorio que permitan sospechar el diagnóstico de LEG <sup>3</sup>.

\* Sanos. Sujetos de cualquier sexo, entre 18 y 50 años de edad, que por interrogatorio no tengan evidencia de enfermedad aguda ni crónica y que no hayan ingerido ácido acetilsalicílico en los últimos 10 días ni otros antiinflamatorios no esteroideos en las últimas 8 horas.

##### Criterios de Inclusión.

1. Pacientes y sujetos sanos que cumplan con las definiciones propuestas.
2. Que acepten participar en el estudio.
3. En el caso de los pacientes, que tengan cuentas plaquetarias > 30,000 plaquetas/mm<sup>3</sup>.

Los pacientes se incluirán independientemente del estado de actividad de la enfermedad y el tratamiento de la misma. Los datos respecto a actividad y tratamiento al momento de la toma, se anotarán con el fin de utilizarlos en caso necesario al analizar los resultados de la Fase I que es en la única en que se utilizarán plaquetas de pacientes.

## V. MATERIAL Y METODOS.

### a) DISEÑO

El estudio se hizo en 4 fases:

- 1a. Producción de un anticuerpo monoclonal (ACM) contra  $\beta$ 2GPI, caracterización del ACM en cuanto a reactividad, reactividad cruzada, determinación de isotipo, de cadenas ligeras.
- 2a. Determinación de la presencia de  $\beta$ 2GPI ex vivo en sujetos sanos y en pacientes con SAF.
- 3a. Unión in vitro de  $\beta$ 2GPI a plaquetas en reposo y activadas de sujetos sanos y pacientes con SAF.

### b) MATERIAL

#### Reactivos.

Cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, ácido fosfórico, fosfatidiletanolamina, tabletas de p-nitrofenilfosfato (sustrato de fosfatasa alcalina), proteína A, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, adyuvante completo e incompleto de Freund, TEMED, trisma-base, naftol AS-MX, fast red, ionóforo de calcio A23187, trombina, colágena, glicina, bolsas de diálisis, pristane, suero bovino fetal, RPMI de Sigma Chemical Co., St Louis MO.

Acrilamida, bis-acrilamida, SDS, persulfato de amonio, tween 20, gelatina, papel de nitrocelulosa, de Bio-Rad laboratories, Richmond CA.

Acido perclórico de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.

Penicilina-estreptomicina, glutamina, polietilenglicol, HT (hipoxantina, timidina), aminopterina y equipo para determinar isotipos y cadenas ligeras de anticuerpos murinos de GIBCO, BRL Gaithersburg, MD.

Los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con fluoresceína (FITC) y con ficoeritrina (PE), los anticuerpos anti-Igs, anti-IgM, anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina son de Sigma Chemical Co. St. Louis MO. El anticuerpo anti-CD62, (anti-GMP140) se obtuvo de Immunotech.

Cajas de cultivo, placas de poliestireno, filtros, tubos de polipropileno y criotubos de Costar, Cambridge, MA.

## Equipo.

Cámara vertical de electroforesis, cámara horizontal de electroforesis, cámara de transferencia de Bio-Rad laboratories, Richmond, CA.

Microscopio invertido de American Optical Corp., Buffalo, NY.

Detector UV de LKB.

Espectrofotómetro de Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA.

Citofluorógrafo de flujo FACScan de Becton Dickinson, Mountain View, CA.

## c) METODOS (+)

### Purificación de la $\beta$ 2GPI.

(+) Las especificaciones de las soluciones utilizadas se encuentran en el anexo I.

#### 1) Precipitación con ácido perclórico.

\* A una unidad de plasma se agrega ácido perclórico 1:33 y se deja incubar durante una hora.

\* Se centrifuga a 4 °C durante 30 min a 5,000 rpm

\* Se obtiene el sobrenadante, ajusta el pH a 7.3, y se dializa contra agua durante 24 hrs. (3 cambios) y contra PBS otras 24 hrs más.

\* Se concentra y determina la cantidad de proteínas.

Con ácido perclórico se obtiene una mezcla de aproximadamente 5 proteínas (proteínas solubles en ácido perclórico), entre las cuales se encuentra la  $\beta$ 2GPI.

#### 2) Electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS, de gradiente 20%-5%

\* Se prepara acrilamida-bis al 5% y al 20%.

Solución de acrilamida stock (ml)	1.25	5
-----------------------------------	------	---

Agua bidestilada (ml)	4.65	0.9
-----------------------	------	-----

Amortiguador tris pH 8.8 (ml)	1.5	1.5
-------------------------------	-----	-----

SDS 10% (ul)	75	75
--------------	----	----

Temed (ul)	3.75	3.75
------------	------	------

Persulfato de amonio (ul)	50	50
---------------------------	----	----

\* Se agrega a las cámaras del formador de gradiente, se montan los geles y se dejan polimerizar.

\* Se agrega la muestra de  $\beta$ 2GPI y otras proteínas, diluida con amortiguador de muestras (sin  $\beta$ -mercaptoetanol) y se corre de manera habitual.

\* Se tiñe el gel con tinción de cobre durante 5 minutos, se enjuaga con agua bidestilada y se corta la banda correspondiente a la  $\beta$ 2GPI. Estas bandas se almacenan en amortiguador de tanque a 4 °C.

#### 3) Electroelución.

\* Se colocan las bandas cortadas en bolsas de diálisis y con amortiguador de tanque, las bolsas se fijan a los extremos de una cámara horizontal de electroforesis y se agrega amortiguador de tanque.

\* Las muestras se electroeluyen a 120 mV durante 4 hrs. cambiando a las dos horas el amortiguador de tanque de la cámara por amortiguador de tanque frío.

\* Se dializan a 4 °C contra PBS durante 24 hrs., con tres cambios.

\* Los fragmentos de gel se desechan y el electroeluido se dializa durante 24hrs contra PBS, posteriormente se concentra y determina la cantidad de proteínas.

#### 4) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 7.5%

\* Se monta la cámara y prepara el gel de resolución, se agrega butanol y se deja polimerizar.

\* Se tira el butanol y se agrega el gel concentrador y el peine correspondiente.

	Gel de resolución	Gel concentrador
Acrilamida stock (ml)	3.8	1.6
Agua bidestilada (ml)	8.0	7.2
Tris pH 8.8 (ml)	3.0	3.0 g
SDS 10% (ul)	150	150
TEMED (ul)	7.5	10
Persulfato de amonio (ul)	50	34

(g) para el gel concentrador se utiliza tris pH 6.8

\* Se agregan las muestras y los pesos moleculares standard diluidos en amortiguador de muestras.

\* Se coloca el amortiguador de tanque y se conecta a la fuente de poder, inicialmente a 100 mV y a 120 mV después, una vez que las muestras entran al gel de resolución.

#### 5) Inmuno-electrotransferencia.

\* Se coloca en la cámara de transferencia el papel filtro, las almohadillas, el gel y el papel de nitrocelulosa.

\* Se agrega el amortiguador de transferencia frío.

\* Se conecta a la fuente de poder a 120mV durante 1 hr.

\* Para bloquear, se coloca el papel de nitrocelulosa con PBS-leche descremada al 3%, en agitación durante una hora y media.

\* Se lava 3 veces con PBS-Tween 0.05% en agitación.

\* Se agrega el primer anticuerpo en este caso anti- $\beta$ 2GPI diluido 1:250 en PBS-leche, durante 2 hrs.

\* Se lava 3 veces con PBS-Tween en agitación.

\* Se agrega el segundo anticuerpo anti-Igs de conejo marcado con fosfatasa alcalina, diluido 1:8000 en PBS-leche, durante 1 hr.

\* Se realizan 3 lavados con PBS-Tween en agitación y un cuarto lavado con amortiguador de tris.

\* Se incuba con el revelador durante 20 minutos y se enjuaga con agua bidestilada.

#### Producción de hibridomas <sup>20,53,66</sup>

#### 6) Crecimiento de línea celular.

\* La línea celular X63 Ag8.653 (mieloma murino) se descongela al sumergir y agitar suavemente el criotubo en un baño de 37°C.

\* Las células se colocan en un tubo y se lavan 3 veces con 10 ml de RPMI no suplementado.

\* Posteriormente, se agrega medio suplementado, se siembran en cajas de cultivo y se mantienen en la estufa. El medio se cambia cuando sea necesario hasta que el número total de células sea de  $3-4 \times 10^7$ . Esta línea se descongela y mantiene en crecimiento las últimas 2 semanas del esquema de inmunización del ratón.

#### 7) Obtención de macrófagos peritoneales.

\* Se sacrifican ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad.

- \* Inmediatamente se limpia y abre la piel del abdomen en una campana de flujo laminar, teniendo cuidado en dejar el peritoneo intacto.
- \* Con una jeringa se inyectan intraperitonealmente 10 ml de PBS estéril frío y a los 30 segundos se extrae nuevamente el líquido con una jeringa.
- \* El líquido extraído contiene macrófagos peritoneales en PBS, los cuales se lavan 3 veces con RPMI no suplementado y se cuentan. Se obtienen alrededor de 5-7 millones de macrófagos por cada ratón.

#### 8) Esquema de Inmunización de ratones.

- \* A un ratón BALB/c de 6 semanas de edad se inyecta por vía subcutánea a nivel inguinal: 80 ug de  $\beta$ 2GPI en 250 ul de PBS + 250 ul de adyuvante completo de Freund, previamente emulsionado.
- \* Dos semanas después, se inmuniza por segunda ocasión con 80 ug de la proteína en PBS + 250 ul de adyuvante incompleto de Freund.
- \* Seguidas por cuatro inmunizaciones exclusivamente con la proteína (80ug/PBS) sin adyuvante de Freund, a los 5,10,12 y 14 días de la segunda inmunización, las primeras tres son por la misma vía y la última por vía intravenosa.
- \* A las 24 hrs de la última inmunización se sacrifica al ratón.

#### 9) Obtención de bazo.

- \* El bazo se extirpa con técnica estéril.
- \* Se coloca inmediatamente en RPMI y se desprende el tejido adyacente primeramente con pinzas y después al pasar el tejido con RPMI a través de una gasa estéril.
- \* Se lava en 3 ocasiones con RPMI no suplementado, y se cuentan las células.

#### 10) Fusión celular.

- \* Las células X63 Ag8.653 se lavan 3 veces en RPMI no suplementado y se cuentan.
- \* Los esplenocitos y las células X63 Ag8.653 se colocan en un mismo tubo, en una relación 2:1.
- \* Se les agregan 15 ml de RPMI no suplementado, se centrifugan y se descarta el sobrenadante.
- \* Lentamente se agrega la solución de polietilenglicol, 1ml por cada  $10^8$  células de la mezcla de fusión.
- \* Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 segundos.
- \* A lo largo de 3 minutos, se agregan 20 ml de RPMI lentamente.
- \* Se centrifugan, elimina el sobrenadante y se resuspenden en HAT  $2-5 \times 10^5$  células/ml de HAT.
- \* Se agregan  $4 \times 10^4$  macrófagos peritoneales/ml de mezcla de fusión (obtenidos 2 horas antes).
- \* Se siembran en placas de 24 pozos.

#### 11) Crecimiento de hibridomas.

- \* Los cultivos se revisan cada 2-3 días, con el fin de evaluar aquellos pozos donde hay fusión y por tanto donde hay hibridomas, los cuales son aquellos en los que hay células vivas.
- \* El medio se cambia cuando es necesario, de acuerdo al viraje del color y se guarda el sobrenadante en todos los casos a  $-20^\circ\text{C}$ . El primer cambio de medio se hace con la mitad del volumen de RPMI suplementado y la otra mitad de medio HAT. En el siguiente se utiliza 75% del volumen de RPMI suplementado y 25% de HAT. Y en el tercero ya se agrega únicamente RPMI suplementado.
- \* En el caso de algún pozo contaminado, se agrega 1 ml de sulfato de cobre 1% + SDS 10%, para evitar que la contaminación se expanda a otros.

#### 12) Congelación.

- \* Las células de aquellos pozos seleccionados por la reactividad de los anticuerpos, se expanden en cajas de cultivo.
- \* Se congela un vial de cada una de las células seleccionadas en mezcla de congelación, a  $-70^\circ\text{C}$  inicialmente y en nitrógeno líquido después. También se congela a  $-20^\circ\text{C}$  el sobrenadante obtenido.



13) Dilución limitada.

- \* Las células seleccionadas se lavan y diluyen en RPMI suplementado.
- \* En una placa de 96 pozos se agregan 100 ul/pozo de una mezcla que contiene 50 células/ml (5 células/pozo).
- \* En una segunda placa se sembran 2 células por pozo y en una tercera una célula por pozo.
- \* En cada uno de los pozos de las tres cajas se agregan previamente macrófagos peritoneales a la misma concentración anteriormente mencionada.

14) Expansión in vitro.

- \* Se evalúan las células de aquellos pozos en los que se muestra crecimiento de una sola clona.
- \* Se trasladan a un pozo de una placa de 24 pozos, también con macrófagos peritoneales obtenidos una hora antes.
- \* Conforme el número de células aumenta y se llena el pozo, éstas se expanden a los pozos adyacentes.
- \* El medio de cultivo se cambia según requerimientos.
- \* Cuando se tienen alrededor de 12 pozos llenos de las mismas células, éstas se trasladan a una caja de cultivo, ya sin macrófagos peritoneales. El sobrenadante se guarda en todo momento.
- \* Se congelan aproximadamente dos viales de cada clona.

15) Expansión in vivo.

- \* A un ratón BALB/c se inyectan intraperitonealmente 0.5 ml de pristane.
- \* Una semana después se inyectan por la misma vía, células de la clona elegida para expandir: 20 millones de células/PBS.
- \* Los ratones se vigilan continuamente para evaluar la producción de ascitis y, aproximadamente a las seis semanas se sacrifican y se extrae la cantidad de ascitis que es posible (aproximadamente 10-15 ml/ratón).
- \* Es posible extraer ascitis sin sacrificar al ratón en este caso, se repone el 70% del volumen obtenido con PBS por vía intraperitoneal.

16) Cromatografía de afinidad con Proteína A-Sefarosa.

Se somete a cromatografía de afinidad el sobrenadante de los cultivos y ascitis:

- \* La columna de proteína A-sefarosa se lava con solución de boratos 1X.
- \* Lentamente, se pasa el sobrenadante o ascitis, llevando el control con un detector UV.
- \* Se lava nuevamente con solución de boratos 1X.
- \* Con solución de glicina se eluye la fracción que se unió a la columna y se recolecta en solución de boratos 4X.
- \* Por último se lava la columna con boratos 1X.
- \* La fracción eluida se dializa contra PBS, se concentra, se determinan proteínas y se guarda a concentración de 1 mg/ml con azida de sodio al 0.02%, a 4°C.

Caracterización del anticuerpo monoclonal.

17) ELISA para determinación de isotipos y cadenas ligeras.

- \* Se realizó por el método de ELISA con un equipo comercial de GIBCO para caracterizar isotipos y cadenas ligeras de anticuerpos murinos, según las recomendaciones del fabricante.

18) ELISA de anticuerpos anti-β2GPI.

- \* A una placa de poliestireno se agregan, 7.5 ug/pozo de β2GPI en PBS y se deja incubar durante dos horas a temperatura ambiente.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* Con PBS-gelatina 0.3%, 300ul/pozo, se bloquea durante dos horas.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* Los anticuerpos en PBS a una concentración de 2.5ug/ml, se agregan (100 ul/pozo) y se incuban una

13) Dilución limitada.

- \* Las células seleccionadas se lavan y diluyen en RPMI suplementado.
- \* En una placa de 96 pozos se agregan 100 ul/pozo de una mezcla que contiene 50 células/ml (5 células/pozo).
- \* En una segunda placa se siembran 2 células por pozo y en una tercera una célula por pozo.
- \* En cada uno de los pozos de las tres cajas se agregan previamente macrófagos peritoneales a la misma concentración anteriormente mencionada.

14) Expansión In vitro.

- \* Se evalúan las células de aquellos pozos en los que se muestra crecimiento de una sola clona.
- \* Se trasladan a un pozo de una placa de 24 pozos, también con macrófagos peritoneales obtenidos una hora antes.
- \* Conforme el número de células aumenta y se llena el pozo, éstas se expanden a los pozos adyacentes.
- \* El medio de cultivo se cambia según requerimientos.
- \* Cuando se tienen alrededor de 12 pozos llenos de las mismas células, éstas se trasladan a una caja de cultivo, ya sin macrófagos peritoneales. El sobrenadante se guarda en todo momento.
- \* Se congelan aproximadamente dos viales de cada clona.

15) Expansión In vivo.

- \* A un ratón BALB/c se inyectan intraperitonealmente 0.5 ml de pristane.
- \* Una semana después se inyectan por la misma vía, células de la clona elegida para expandir: 20 millones de células/PBS.
- \* Los ratones se vigilan continuamente para evaluar la producción de ascitis y, aproximadamente a las seis semanas se sacrifican y se extrae la cantidad de ascitis que es posible (aproximadamente 10-15 ml/ratón).
- \* Es posible extraer ascitis sin sacrificar al ratón en este caso, se repone el 70% del volumen obtenido con PBS por vía intraperitoneal.

16) Cromatografía de afinidad con Proteína A-Sefarosa.

Se somete a cromatografía de afinidad el sobrenadante de los cultivos y ascitis:

- \* La columna de proteína A-sefarosa se lava con solución de boratos 1X.
- \* Lentamente, se pasa el sobrenadante o ascitis, llevando el control con un detector UV.
- \* Se lava nuevamente con solución de boratos 1X.
- \* Con solución de glicina se eluye la fracción que se unió a la columna y se recolecta en solución de boratos 4X.
- \* Por último se lava la columna con boratos 1X.
- \* La fracción eluida se dializa contra PBS, se concentra, se determinan proteínas y se guarda a concentración de 1 mg/ml con azida de sodio al 0.02%, a 4°C.

Caracterización del anticuerpo monoclonal.

17) ELISA para determinación de isotipos y cadenas ligeras.

- \* Se realizó por el método de ELISA con un equipo comercial de GIBCO para caracterizar isotipos y cadenas ligeras de anticuerpos murinos, según las recomendaciones del fabricante.

18) ELISA de anticuerpos anti- $\beta$ 2GPI.

- \* A una placa de poliestireno se agregan, 7.5 ug/pozo de  $\beta$ 2GPI en PBS y se deja incubar durante dos horas a temperatura ambiente.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* Con PBS-gelatina 0.3%, 300ul/pozo, se bloquea durante dos horas.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* Los anticuerpos en PBS a una concentración de 2.5ug/ml, se agregan (100 ul/pozo) y se incuban una

hora a temperatura ambiente.

- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* El anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina se agrega, diluido 1:1000 en PBS-gelatina 0.3% y se incuba una hora.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* El sustrato de la enzima diluido en amortiguador de dietanolamina (1tab/5 ml), se agrega (300 ul/pozo) y se deja incubar durante una hora.
- \* La lectura se hace en el lector de ELISA a 405 nm.

En los experimentos de tamizaje antes de seleccionar los hibridomas, el segundo anticuerpo que se utilizó en el ELISA de anti-β2GPI fue anti-inmunoglobulinas de ratón, una vez seleccionados y expandidos los hibridomas y conociendo el isotipo IgG de todos ellos se usó anti-IgG de ratón.

19) ELISA de anticuerpos contra: CL, FTS, FTC, AF, FTI, FE.

- \* A una placa de poliestireno se agregan 50 ul/ml de una solución de etanol-CL (ó FTS, AF, FTC, FTI, FE) a concentración aproximada de 2.15 µg/pozo de CL. Esta concentración se obtiene: 7.5ml de etanol + 75 ul de fosfolípido si este viene a una concentración de 5mg/ml.
- \* Se coloca la placa en una cámara de nitrógeno gaseoso hasta que se evapora la solución de todos los pozos.
- \* La placa se bloquea con PBS gelatina 0.3% 350 ul/pozo, se incuba por dos horas a temperatura ambiente.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* De los ACM diluidos en PBS-gelatina 0.3%, se agregan 200 ul y se incuban por una hora.
- \* Se lavan 3 veces con PBS.
- \* El anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina diluido 1:1000 en PBS-gelatina 0.3%, se agrega e incuba durante una hora a temperatura ambiente.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* Se agrega el sustrato de la enzima diluido en amortiguador de dietanolamina (1 tab/5ml), 200 ul/pozo y se incuba durante una hora en la oscuridad a 37°C.
- \* La lectura se realiza en un lector de ELISA a 405 nm.

20) ELISA de anticuerpos anti-DNA

- \* A una placa de poliestireno, se agregan 100 ul/pozo de albúmina sérica bovina metilada al 0.1% en PBS.
- \* Se incuba 2 hrs a temperatura ambiente y posteriormente se sacude la placa para eliminar la albúmina no unida, sin lavar.
- \* Se agrega DNA simple o de doble cadena: 10 ug/ml en PBS-EDTA 1mM, 50 ul/pozo durante 1 hr a temperatura ambiente.
- \* Se lava tres veces con PBS-EDTA 1mM.
- \* La placa se bloquea con PBS-EDTA 1mM-suero bovino fetal al 10%, 300 ul/pozo, durante 1 hora.
- \* Se lava 5 veces con 300 ul/pozo de PBS-EDTA 1mM-Tween 0.05%.
- \* Los anticuerpos diluidos se agregan a una concentración de 2.5 ug/ml, en PBS-EDTA-suero bovino fetal, además de una curva de diluciones seriadas: 100 ul/pozo durante una hora.
- \* Se hacen 5 lavados con PBS-EDTA-Tween
- \* El anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina: 100 ul/pozo disuelto en PBS-EDTA-SBF 1:1000, se agrega e incuba durante una hora.
- \* Se lava 5 veces.
- \* El sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato) (1 tableta/5 ml) se agrega disuelto en amortiguador de dietanolamina.
- \* La reacción se detiene con 50 ul de NaOH 3N y se lee a 405 nm.

#### 21) ELISA de anticuerpos anti-heparina

- \* A una placa de poliestireno, se agrega heparina 5000 UI, 100 ul/pozo.
- \* Se incuba una hora a temperatura ambiente.
- \* Se lava 3 veces con PBS
- \* Con PBS-gelatina 0.3% se bloquea durante una hora.
- \* Se lava 3 veces con PBS
- \* Los anticuerpos diluidos 2.5 ug/ml en PBS, 100 ul/pozo se agregan durante una hora.
- \* Se lava 3 veces con PBS
- \* El anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina: 100 ul/pozo diluido en PBS-gelatina, 1:1000, se agrega e incuba durante una hora.
- \* Se lava 3 veces
- \* El sustrato de la enzima, se agrega disuelto en amortiguador de dietanolamina (1 tableta/5 ml).
- \* Se lee en un lector de ELISA a 405nm

#### Ensayos de Inhibición.

#### 22) ELISA

- \* Una placa de poliestireno se sensibiliza con concentraciones variables de  $\beta$ 2GI (de a ug/pozo) y se incuba durante 2 hrs a temperatura ambiente.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* Con PBS-gelatina 0.3% 300/ul/pozo, se bloquea durante dos horas.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* Los anticuerpos en PBS se agregan a una concentración de 2.5 ug/ml, 100 ul/pozo y se incuban durante una hora a temperatura ambiente.
- \* Se recoge el sobrenadante (los anticuerpos no unidos y los guardamos)
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* El anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en PBS-gelatina 0.3% , se agrega e incuba durante una hora.
- \* Se lava 3 veces con PBS.
- \* El sustrato de la enzima diluido en amortiguador de dietanolamina (1tab/5 ml), 300 ul/pozo se agrega durante una hora.
- \* Posteriormente, se lee en el lector de ELISA a 405 nm.
  
- \* Los anticuerpos no unidos (el sobrenadante) se prueban en una nueva placa de ELISA con  $\beta$ 2GPI a concentraciones constantes (10 ug/pozo) y el resto del ELISA se hace de manera convencional.

#### 23) Inmunopunto.

- \* Un fragmento de papel de nitrocelulosa en forma rectangular, se coloca en amortiguador de transferencia durante 15 minutos y se deja secar a temperatura ambiente.
- \* Se coloca el papel en la cámara de inmunopunto.
- \* En cada pozo se agrega el antígeno ( $\beta$ 2GPI 5 ug/50 ul) y se deja secar.
- \* Con PBS-leche descremada 3%, se bloquea durante una hora.
- \* Se hacen 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0.05%.
- \* Los anticuerpos 2.5 ug/pozo, diluidos en PBS-leche se agregan e incuban 2 hrs a temperatura ambiente.
- \* Se lava 3 veces con PBS-Tween.
- \* El segundo anticuerpo diluido con PBS-leche (1:1000), se agrega durante una hora a temperatura ambiente.
- \* Se hacen 3 lavados con PBS-Tween en agitación y un cuarto lavado con amortiguador de tris.
- \* Se incuba con el revelador durante 20 minutos y se enjuaga con agua bidestilada.

Marcaje de los anticuerpos.

24) Marcaje con fluoresceína (FITC).

- \* La proteína se dializa en amortiguador de carbonatos durante 24 hrs (3 cambios).
- \* Se agregan 0.05mg de isotiocianato de fluoresceína/mg de proteína y se mezclan durante toda la noche a 4°C.
- \* Se dializan durante 24 hrs contra PBS.
- \* La relación F/P se obtiene por la lectura en el espectrofotómetro a absorbancias de 280 y a 495 nm:

$$\text{Relación molar} = \frac{2.87 \times \text{Abs}_{495\text{nm}}}{\text{Abs}_{280} - (0.35 \times \text{Abs}_{495})}$$

La relación F/P debe ser entre 2-4.

25) Marcaje con ficoeritrina (PE)<sup>75,98</sup>.

Preparación de PE tiolada.

- \* Se agrega R-PE (3.6 mg/ml) 1.2 ml a 600 ul de hidrocloreuro de iminotiolano y dejamos incubar a 90 minutos a temperatura ambiente.
- \* Durante la noche se dializa contra amortiguador de fosfato de Na pH 6.8 a 4°C.
- \* Posteriormente, se dializa durante dos días contra amortiguador de fosfato de Na pH 7.5 a 4°C.

25) Marcaje del anticuerpo con ficoeritrina.

\* Se preparan:

- Solución de hidrocloreuro de iminotiolano 15.5mg/ml
- R-PE 3.6 mg/ml
- Amortiguador de fosfato de Na 125mM pH 6.8
- Amortiguador de fosfato de Na 50mM pH 6.8
- Amortiguador de fosfato de Na 50mM pH 7.5
- N succinimidil 3-2 piridilo-propionato (SPDP) 1.1mg/ml en etanol
- Anticuerpo (IgG) 4.2 mg/ml en amortiguador de fosfato de Na 50MM pH 7.5
- Iodoacetato de Na 80 mM

- \* Se agregan 700 ul del anticuerpo en amortiguador de fosfato de sodio a 30 ml de SPDP (la relación molar de SPDP-IgG deber ser 5.3).
- \* Y se incuba 2 horas y media a temperatura ambiente.
- \* Se agregan a 500 ul de anticuerpo-SPDP, la PE tiolada a concentración de 1.7 mg/ml en el mismo amortiguador (la relación molar debe ser 4.7).
- \* Se incuban 12 hrs a temperatura ambiente.
- \* Para detener la reacción se agregan 100 ul de iodoacetato.

Obtención y preparación de plaquetas para citometría de flujo

26) Obtención de plaquetas.

- \* Se obtienen 10 ml de sangre venosa periférica con EDTA 3% (1:9)
- \* Para separar el plasma rico en plaquetas se centrifuga a 1800 rpm/10 min.
- \* El botón plaquetario se lava 3 veces con PBS-EDTA 1mM.

27) Activación plaquetaria.

- \* Al botón plaquetario se agregan 10 ul cloruro de calcio y posteriormente A23187 20 ul a una concentración de 15 uM o tromblina 20 ul a concentración de 1U/ml o 20 ul de colágena a una concentración de 2mg/ml.

- \* Se incubó durante 20 minutos a 37 ° C.
- \* Se lavó con PBS-EDTA.
- \* Las plaquetas resuspendidas, se fijan con formaldehído al 3% en PBS.
- \* Las plaquetas en reposo se preparan agregando formaldehído al 3% en PBS después de los lavados de separación.

#### 28) Marcaje de plaquetas/citometría de flujo

- \* El botón plaquetario se resuspende y se agrega  $\beta$ 2GPI marcada con fluoresceína o anti- $\beta$ 2GPI fluoresceinados (20  $\mu$ l), se incuban por 60 minutos en hielo.
- \* Se lava con PBS-EDTA frío
- \* El botón plaquetario se resuspende y se agrega el segundo anticuerpo: anti-GMP140 (anti-CD62) con ficoeritrina 20  $\mu$ l y se incuban por 60 minutos en hielo.
- \* Se lavan con PBS-EDTA frío.
- \* La lectura de la fluorescencia se realiza en el citómetro de flujo<sup>39</sup>.

## VI. ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizaron pruebas no paramétricas: U de Mann Whitney, Wilcoxon y r de Spearman, las comparaciones realizadas con estas pruebas fueron:

- \*  $\beta$ 2GPI en plaquetas de sujetos sanos vs  $\beta$ 2GPI en plaquetas de pacientes.
- \* Unión de  $\beta$ 2GPI a plaquetas en reposo vs activadas; dobles positivas ( $\beta$ 2GPI positivas + GMP140 positivas) en ambos grupos.
- \* Unión aFL a plaquetas en reposo vs activadas; dobles positivas (aFL positivas +  $\beta$ 2GPI positivas) en ambas fracciones.

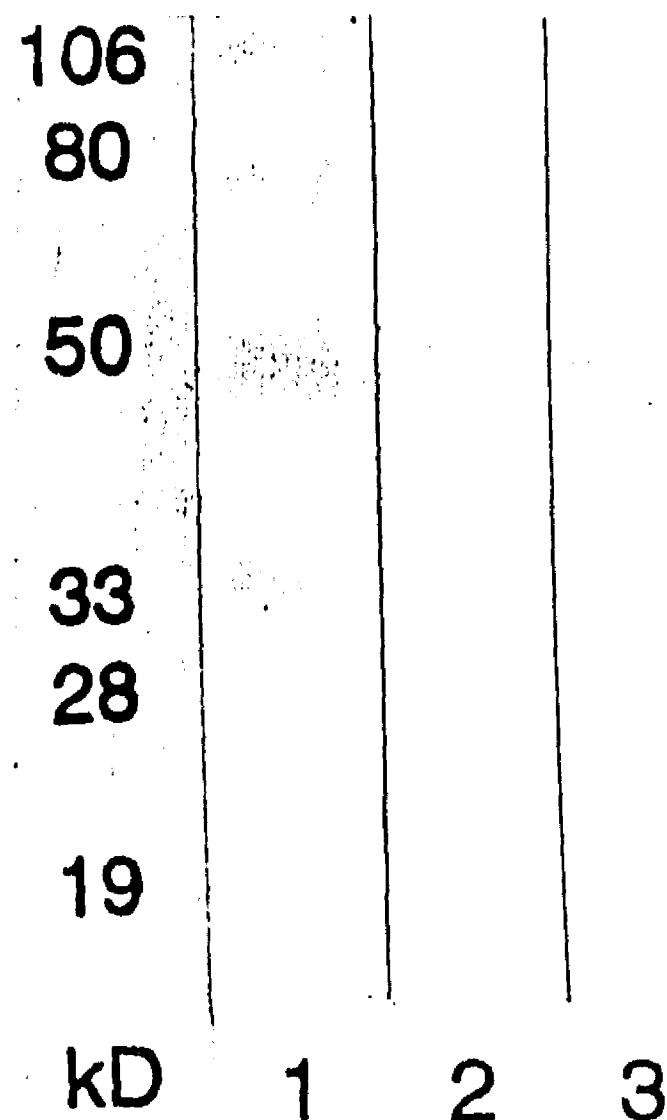
## VII. FINANCIAMIENTO

El proyecto fue financiado por CONACYT a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica.

## VIII. RESULTADOS

### a) Purificación de la proteína.

Se purificaron en total 8 mg de  $\beta$ 2GPI, cuya pureza se probó en un gel de poliacrilamida con SDS y su reactividad con suero policlonal de conejo anti- $\beta$ 2GPI (figura 1). La proteína se utilizó para la inmunización, estudios de tamizaje, ensayos de inhibición y marcaje con fluoresceína. Se mostró la capacidad de la proteína de funcionar como cofactor de aFL: El suero de un paciente con títulos altos de aFL, se probó con cardiolipina únicamente en el ensayo de ELISA sin fuente de  $\beta$ 2GPI y posteriormente con CL+  $\beta$ 2GPI, lo cual mostró como resultado 0.08 y 0.350 DO respectivamente.



**Figura 1.  $\beta$ 2GPI purificada.** Gel no reducido de poliacrilamida al 7.5% con SDS y transferido a papel de nitrocelulosa. 1. Pesos moleculares estándar, 2: Tinción con amido-negro 3: Inmunoelectrotransferencia utilizando suero policlonal de conejo anti- $\beta$ 2GPI humana y como segundo anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina. En el carril 2 se observa una sola banda de aproximadamente 50 kD que corresponde al peso molecular de  $\beta$ 2GPI no reducida. En el carril 3 se corrobora la misma banda de  $\beta$ 2GPI según el ensayo de inmunoelectrotransferencia.

## b) Anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ 2GPI

### b.1 Reactividad de los anticuerpos con $\beta$ 2GPI.

Inicialmente se eligieron 50 pozos en los cuales había crecimiento celular posterior a la fusión y se probó su reactividad contra  $\beta$ 2GPI, de los 11 que la mostraron se seleccionaron tres para realizar dilución limitada (tabla 1).

Pozo	anti-Igs	anti-IgG	anti-IgM
A	0.288	0.406	0.097
B	0.234	0.254	0.153
C *	0.476	0.601	0.162
D	0.267	0.307	0.178
E	0.259	0.264	0.131
F *	0.633	0.825	0.139
G *	0.348	0.654	0.090
H	0.215	0.354	0.113
I	0.230	0.281	0.132
J	0.260	0.248	0.192
K	0.210	0.160	0.133

**Tabla 1. Reactividad anti- $\beta$ 2GPI del sobrenadante de 11 pozos seleccionados.**

Los sobrenadantes se probaron sin diluir en un ensayo de ELISA, las cifras muestran los resultados en densidades ópticas.

(\*) Seleccionadas para hacer dilución limitada.

Después de la dilución limitada se eligieron 6 hibridomas que se consideraron los óptimos

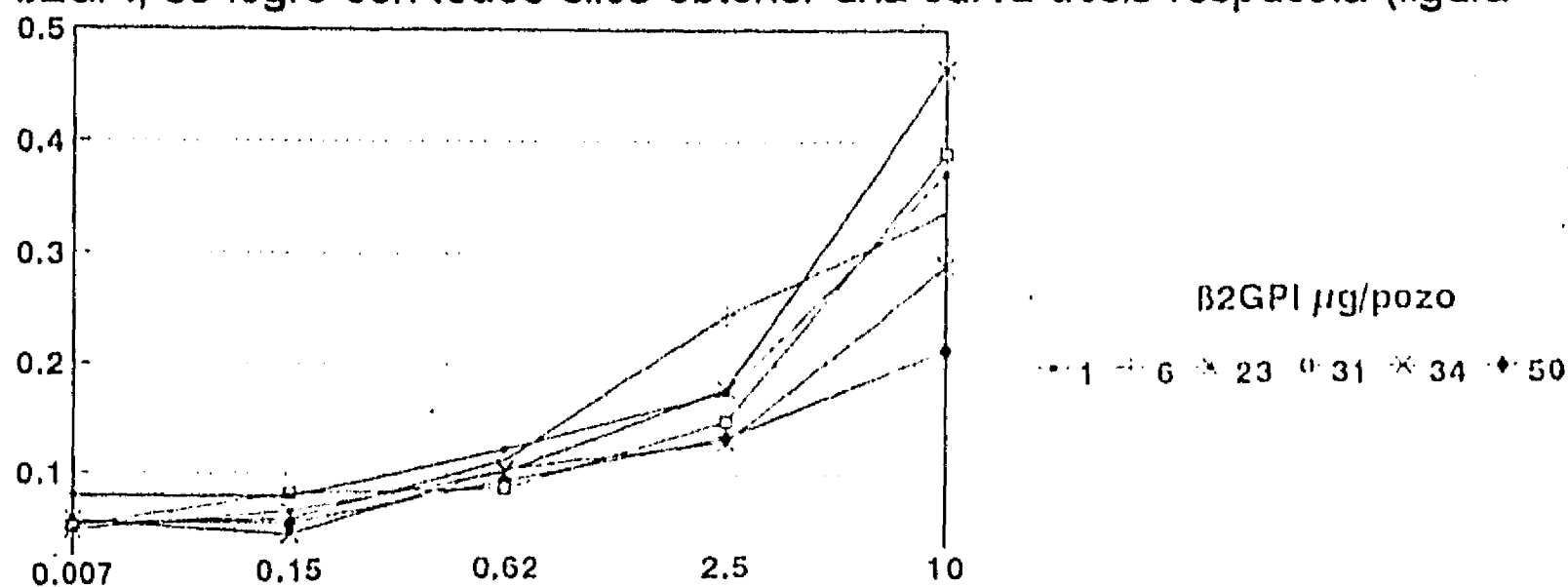


posterior a que se determinó la reactividad de los anticuerpos producidos con CL, FTS,  $\beta$ 2GPI y mezclas de éstos (tabla 2); éstos fueron los que se mostró que tenían menor reactividad con fosfolípidos por sí solos y mayor con  $\beta$ 2GPI, según se muestra en la tabla, varios de ellos reaccionaban con el complejo fosfolípidos/ $\beta$ 2GPI.

ACM	CL	FTS	$\beta$ 2GPI	CL/ $\beta$ 2	FTS/ $\beta$ 2
1	0.075	0.107	0.220	0.208	0.104
6	0.290	0.135	0.131	0.350	0.187
23	0.064	0.096	0.191	0.139	0.090
31	0.126	0.127	0.190	0.146	0.140
34	0.078	0.116	0.164	0.221	0.137
50	0	0.034	0.100	0.051	0.032

**Tabla 2. Reactividad de los ACM contra CL, FTS,  $\beta$ 2GPI y combinaciones de éstos.** Los sobrenadantes se probaron sin diluir en un ensayo de ELISA, las cifras muestran los resultados en densidades ópticas.

Se probó la capacidad de los 6 anticuerpos seleccionados de reaccionar con dosis variables de  $\beta$ 2GPI, se logró con todos ellos obtener una curva dosis respuesta (figura 2).

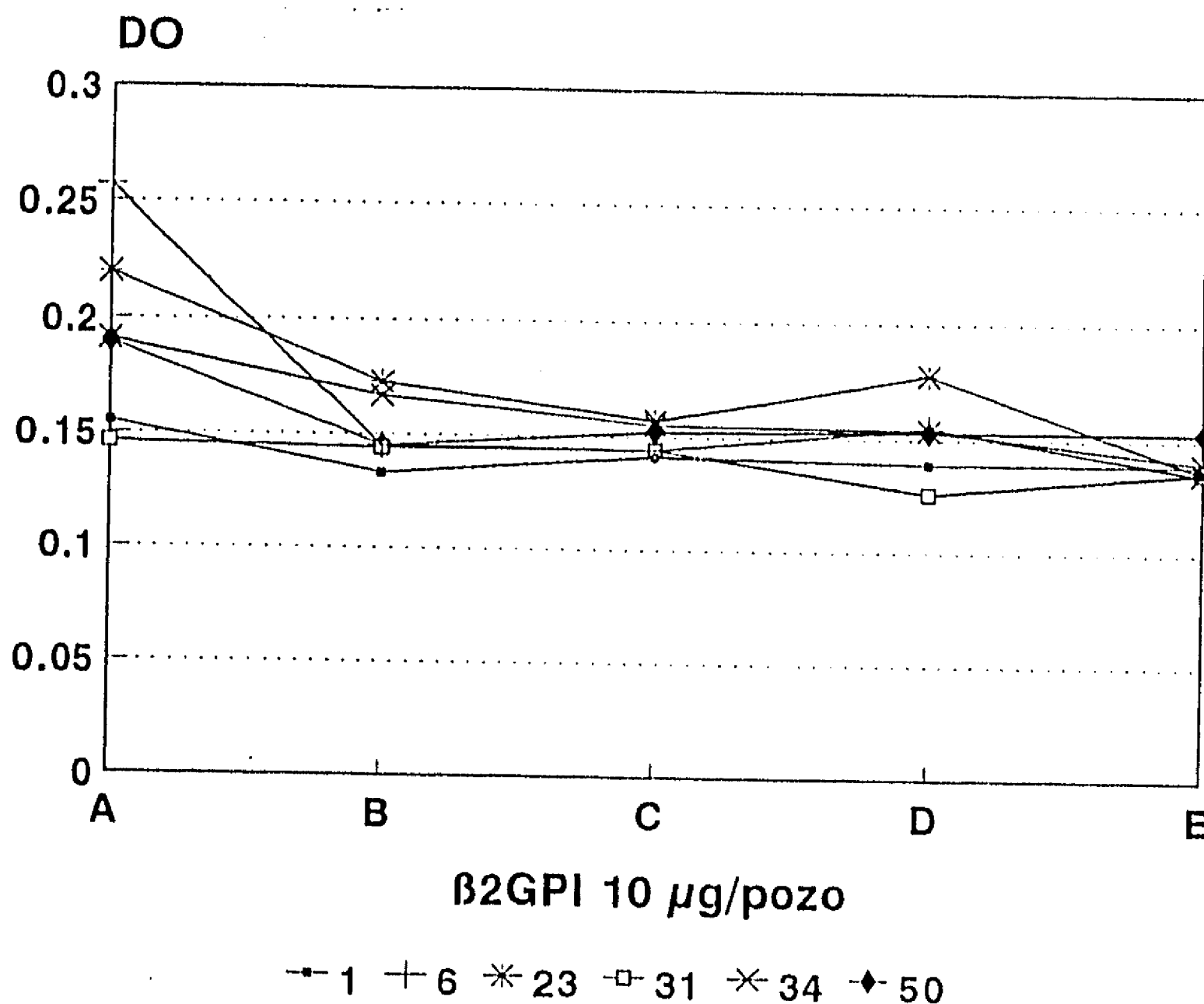


**Figura 2. Reactividad de los ACM con dosis variables de  $\beta$ 2GPI.**

## b.2 Ensayos de inhibición.

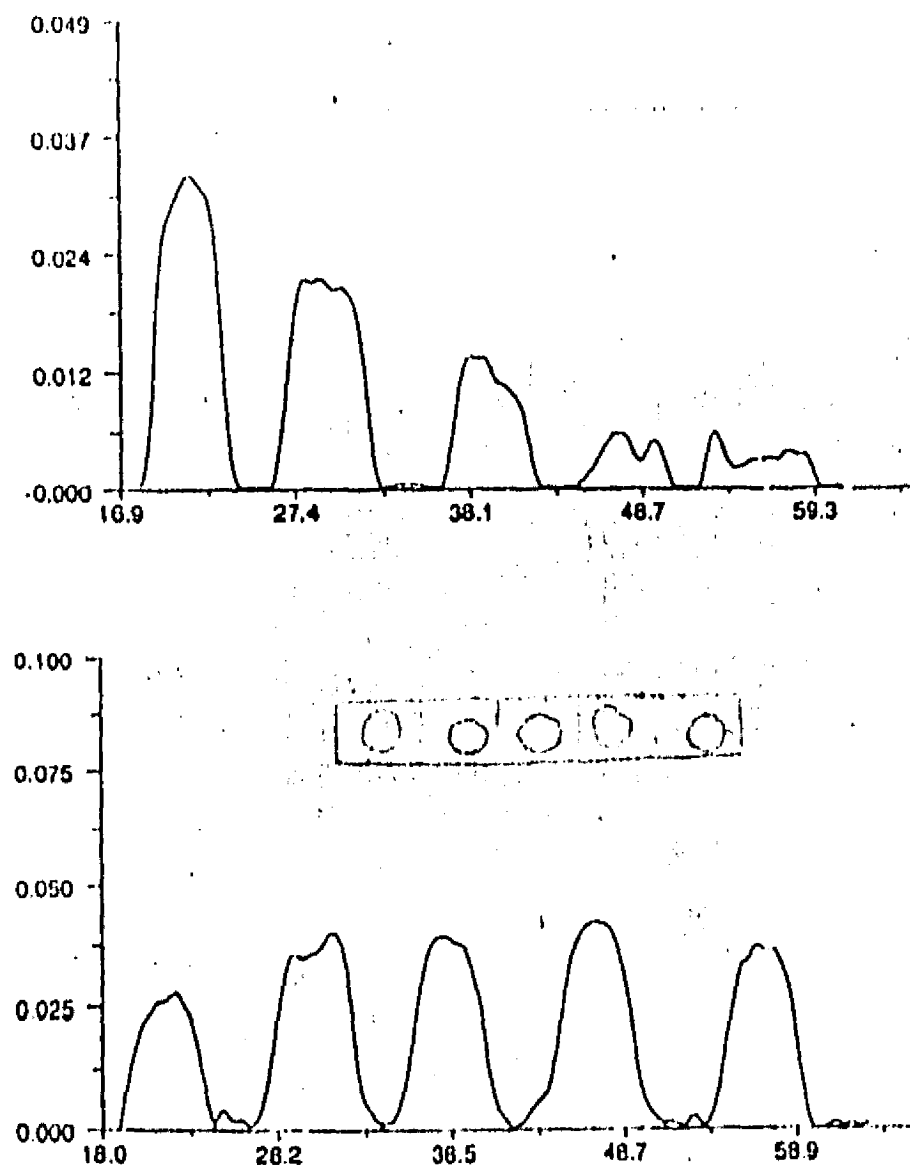
Se realizaron diversos intentos de inhibir la reactividad de los ACM con  $\beta$ 2GPI y  $\beta$ 2GPI+CL a dosis variables a pesar de ello, no se obtuvieron curvas de inhibición.

Cuando se probaron los ACM con  $\beta$ 2GPI, a través de los diversos métodos, se obtienen curvas dosis-respuesta en la unión de antígeno-anticuerpo, sin embargo se obtienen únicamente líneas horizontales en los diversos ensayos de inhibición. Estos ensayos de inhibición se realizaron utilizando la  $\beta$ 2GPI tanto en fase líquida (incubación de ACM anti- $\beta$ 2GPI y  $\beta$ 2GPI en solución), como en fase sólida (ensayos de ELISA e inmunopunto con densitometría) sin que se encontraran diferencias con relación a la respuesta (figuras 3 y 4).



**Figura 3. Curvas de inhibición de los ACM.**

Los anticuerpos se incubaron con dosis decrecientes de  $\beta$ 2GPI A:10 $\mu$ g/pozo, B: 2.5  $\mu$ g/pozo, C:0.62  $\mu$ g/pozo, D:0.15  $\mu$ g/pozo y E:0.007  $\mu$ g/pozo, posteriormente se recogió el sobrenadante (anticuerpos no unidos) y se probaron por el método de ELISA con 10  $\mu$ g/pozo de  $\beta$ 2GPI.



**Figura 4. Inmunopunto representativo de los ensayos de inhibición.**

El ACM 23 se incubó con dosis decrecientes de  $\beta$ 2GPI (mismas que en la figura previa). En A se muestra de izquierda a derecha el inmunopunto y abajo de éste la grafica de densitometría correspondiente, cada uno de los picos corresponde a la densidad de uno de los puntos. En B se muestran los resultados del ensayo de inhibición, inmunopunto y densitometría correspondiente, al probar el sobrenadante recogido de los pozos de A y probarlos con  $\beta$ 2GPI 10 ug/pozo.

**b.3 Reactividad cruzada.**

Los anticuerpos se probaron para determinar su reactividad con otros fosfolípidos tanto aniónicos como neutros así como la reactividad contra DNA de doble cadena y heparina. No se encontró reactividad con otros fosfolípidos aniónicos (FTI y AF), ni con fosfolípidos neutros (FTC y FE) y DNA dc. En cuatro de ellos se mostró reactividad con heparina (tabla 3).

ACM	FTI	AF	FTC	FE	DNAdc	Heparina
1	0	0.04	0.08	0.06	0	0.03
6	0	0	0.06	0.04	0	0.20
23	0	0.08	0.001	0	0	0.17
31	0	0	0.01	0	0	0.007
34	0	0	0.02	0	0.01	0.253
50	0	0	0	0.012	0	0.137

**Tabla 3. Reactividad de los ACM con otros fosfolípidos, DNAdc y heparina.** Las cifras muestran los resultados en densidades ópticas.

#### **b.5 Isotipos y cadenas ligeras de ACM**

Los 6 anticuerpos que se seleccionaron son isotipo IgG2b, todos ellos con cadenas ligeras kappa.

#### **c) Unión de aFL a plaquetas utilizando diversos agonistas.**

Se utilizaron aFL purificados de pacientes con SAFP y plaquetas en reposo y activadas con diversos agonistas, provenientes de sujetos sanos. A las plaquetas se agregaron los aFL marcados con fluoresceína en presencia de  $\beta$ 2GPI y se determinó su capacidad de unión a las mismas por citometría de flujo. Simultáneamente se utilizó como marcador de activación el anticuerpo monoclonal antiGMP140 o anti-CD62 marcado con ficoeritrina (tabla 4). Se mostró que los aFL- $\beta$ 2GPI se unen más a plaquetas activadas con los diversos agonistas que, a plaquetas en reposo (22-31% vs 8.2% respectivamente). Dicha unión tiene pocas variaciones con los diversos agonistas que se utilizaron, aunque la mayor unión de aFL fue a las plaquetas que se activaron con trombina por sí sola o con

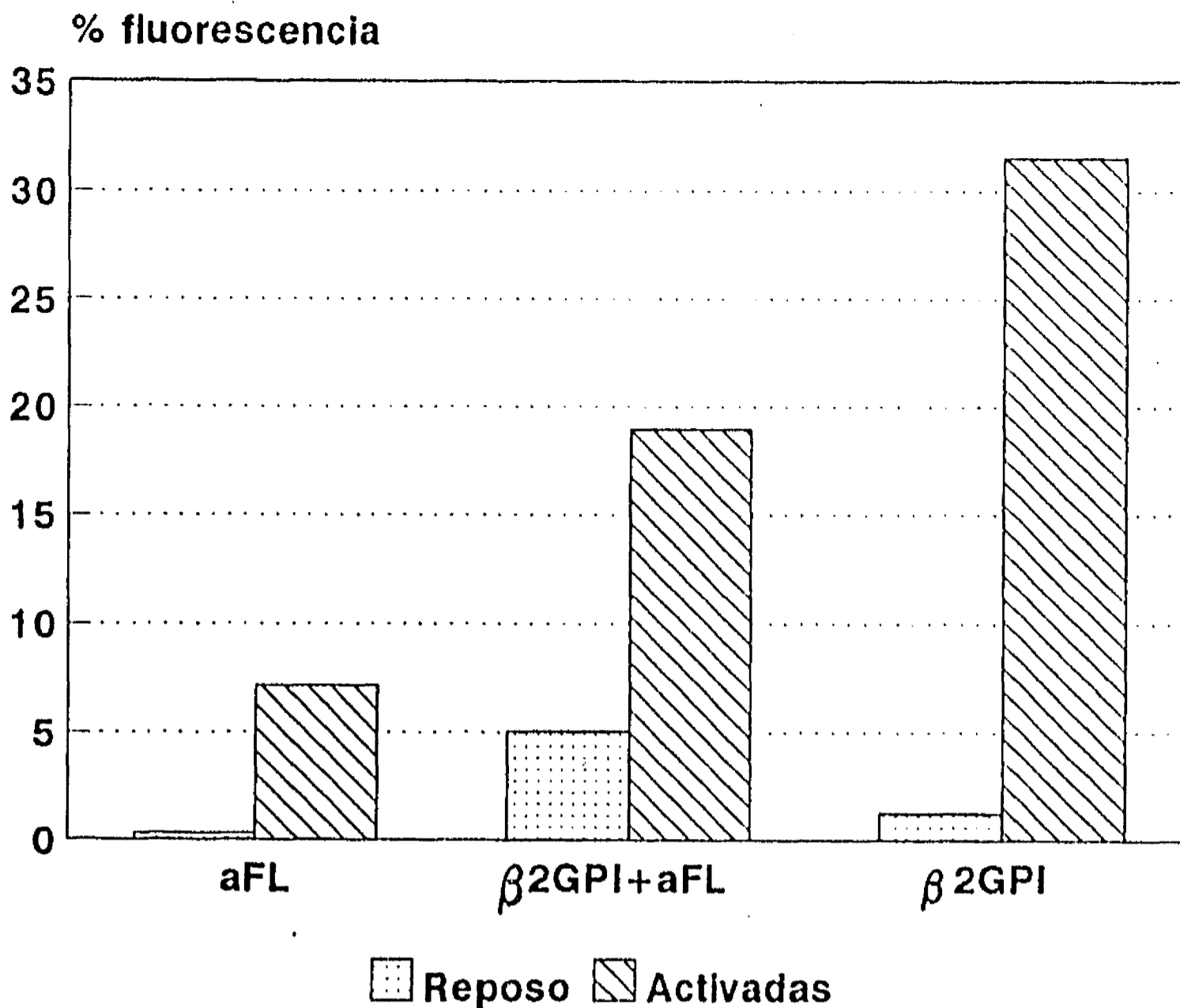
trombina + A23187. Aunque se encontró una diferencia clara entre el porcentaje de unión de anti-GMP140 a plaquetas en reposo y activadas (2.52% vs 16-49.7%), el grado de expresión de este marcador de activación fue variable con los diversos agonistas.

Posteriormente, se evaluó si la unión de aFL a plaquetas activadas estaba dada por la presencia de  $\beta$ 2GPI en el ensayo y si la proteína era capaz por sí sola de unirse a plaquetas activadas; se encontró que los aFL por sí solos se unieron a plaquetas activadas pero que, dicha unión fue mayor cuando se agregó  $\beta$ 2GPI no marcada al ensayo. La  $\beta$ 2GPI se unió por sí sola a plaquetas activadas (figura 5).

Agonista	aFL	Intervalo	aGMP140	Intervalo
Ninguno	8.24	4.9-11.5	2.52	2.4-2.6
Trombina	31.41	10.2-61.2	49.7	35.7-64.4
Colágena	23.49	6.8-34.7	29.3	10.3-48.4
A23187	22.39	20.5-24.3	46.3	28.3-64
Trombina + colágena	26.5	20.3-30.9	33.3	22.1-44.5
Trombina + A23187	30.74	10.9-50.5	16.7	10.8-22.7
Colágena + A23187	25.58	20.6-30.5	33.6	15.3-51.6

**Tabla 4. Unión de aFL (en presencia de  $\beta$ 2GPI) y aGMP140 a plaquetas activadas utilizando diversos agonistas.**

Los ensayos se hicieron por citometría de flujo, los valores representan la mediana del porcentaje de fluorescencia.



**Figura 5. Unión de aFL FITC, aFL FITC en presencia de β2GPI y de β2GPI FITC a plaquetas en reposo y activadas.**  
 Los resultados muestran las medianas de los diversos ensayos.

**d) Unión de β2GPI marcada a plaquetas.**

Se determinó si la unión de β2GPI a plaquetas activadas era similar cuando se usaron plaquetas de sujetos sanos y plaquetas de pacientes con SAF y si las plaquetas de los pacientes respondían de la misma manera a la activación con agonistas. Una vez más se encontró mayor unión de β2GPI a plaquetas activadas que a plaquetas en reposo sin embargo no se encontraron diferencias en el comportamiento de las plaquetas de controles vs plaquetas de pacientes con SAF. El porcentaje de positividad para GMP140 se encontró diferente en plaquetas estimuladas con los diversos agonistas, que en plaquetas no estimuladas, comprobando que efectivamente las primeras estaban activadas. Se encontró correlación positiva alta entre la unión de β2GPI a plaquetas y la expresión del marcador de activación en los sujetos sanos ( $r=0.933$ ) y menor ( $r=0.672$ )

cuando se usaron las plaquetas de los pacientes (tabla 5, figura 6).

<b>Plaquetas</b>	<b>Controles</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Total(ç)</b>
Reposo + β2GPI FITC	1.17 0.72 - 2.05	1.46 0.63 - 6.24	1.26 0.63 - 6.24
Activadas + β2GPI FITC	25.5 11.7 - 46.3	32.15 18.3 - 46.5	31.5 11.7 - 46.5
Reposo + aGMP140 PE	3.55 1.46 - 26.7	1.95 1-31 - 45.94	2.7 1.31 - 45.9
Activadas + aGMP140 PE	42.8 27 - 68.05	59.5 31.8 - 77.9	56.0 27 - 77.9

**Tabla 5. Unión de β2GPI FITC a plaquetas en reposo y activadas de controles y pacientes con SAF.**

\* Total: Controles + pacientes.

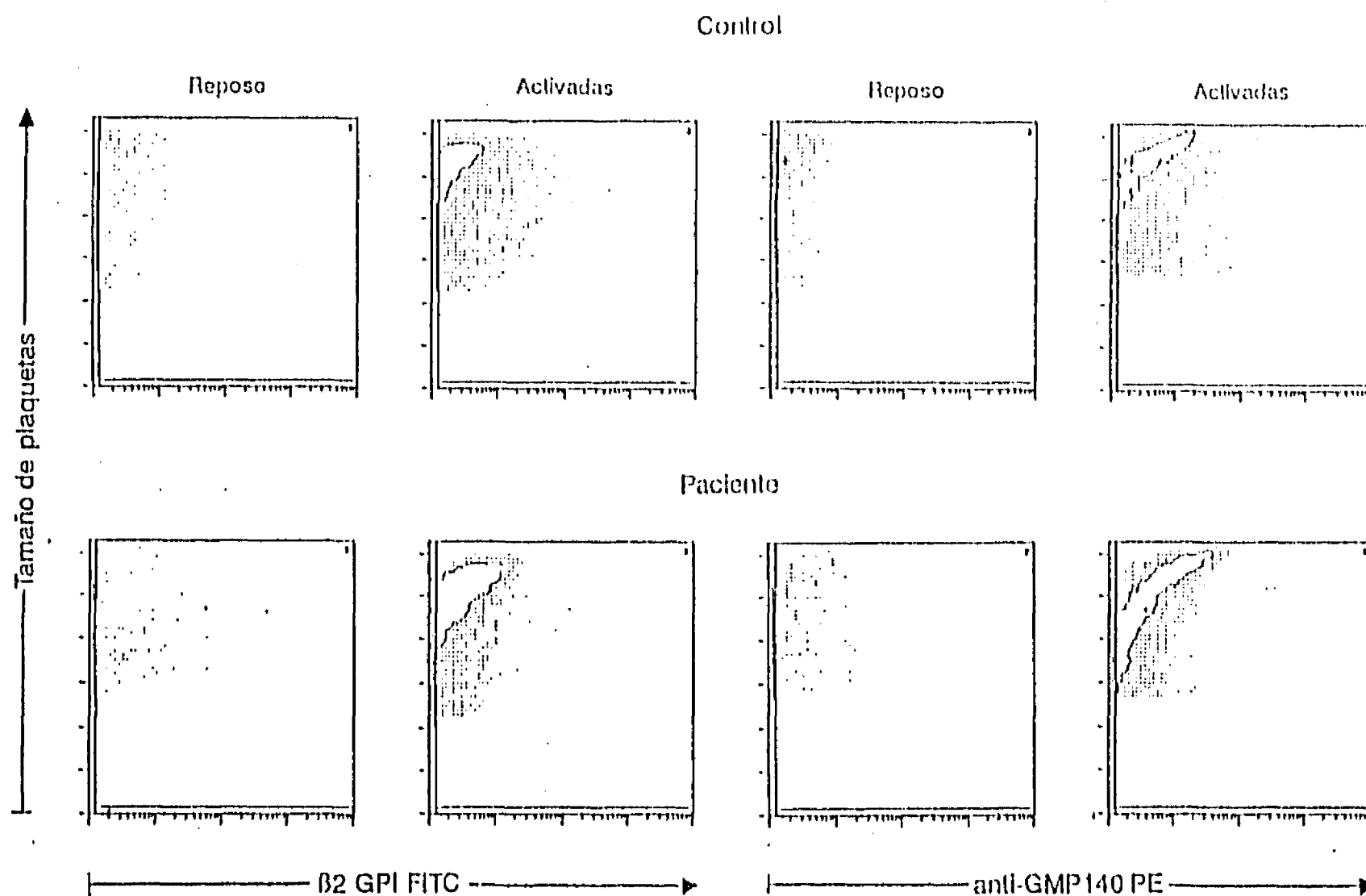
Los números representan la mediana del porcentaje de fluorescencia, entre paréntesis se muestran los intervalos.

Controles: β2GPI reposo vs β2GPI activadas  $p=0.003$ , aGMP140 reposo vs aGMP140 activadas  $p=0.003$ .

Pacientes: β2GPI reposo vs β2GPI activadas  $p=0.0004$ , aGMP140 reposo vs aGMP140 activadas  $p=0.0004$ .

Total: β2GPI reposo vs β2 GPI activadas  $p=0.0000009$ , aGMP140 reposo vs aGMP140 activadas  $p=0.0000009$ . Las comparaciones se hicieron con prueba de Wilcoxon.

r Spearman: β2GPI activadas y aGMP140 activadas en controles 0.933, β2GPI activadas y aGMP140 activadas en el grupo total 0.672, las otras correlaciones fueron  $<0.31$ .



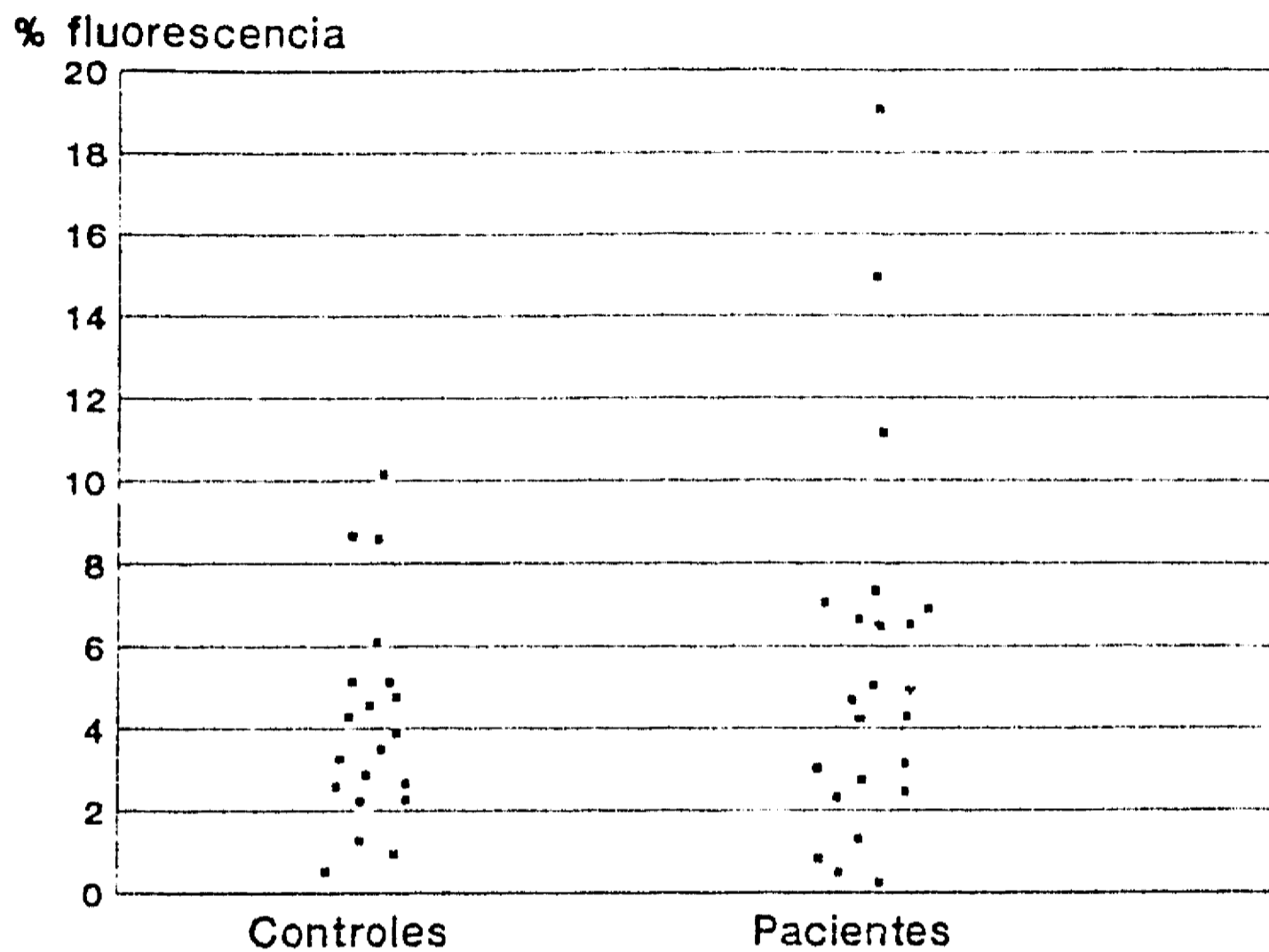
**Figura 6. Unión de  $\beta$ 2GPI FITC y aGMP140 PE a plaquetas de un sujeto control y un paciente. Citometría de flujo representativa.**

**e) Unión de anti- $\beta$ 2GPI marcados a plaquetas.**

Probamos si existía mayor cantidad de  $\beta$ 2GPI ex vivo unida a membrana plaquetaria de sujetos sanos y de pacientes con SAF primario y secundario, lo cual nos hablaría que en los pacientes hay activación plaquetaria in vivo y unión de  $\beta$ 2GPI a la membrana plaquetaria. Para ello agregamos los ACM marcados a plaquetas de los pacientes y a



plaquetas de controles sanos. No encontramos diferencias claras entre ambos grupos. Tampoco hubo diferencias cuando los pacientes estaban con un evento trombótico reciente al compararlos con los pacientes con historia de trombosis (tabla 6 y figura 7).



**Figura 7.  $\beta$ 2GPI en la membrana plaquetaria de pacientes con SAF y controles sanos.**

Los puntos representan el porcentaje de unión del ACM anti- $\beta$ 2GPI marcado a plaquetas. Cada punto representa a un paciente o un sujeto control. \* Pacientes con evento trombotico reciente.

Pacientes		Manifestaciones clínicas					Expresión en plaquetas	
SAFP	Sexo/ edad	TrV	PFR	TCP	AH	LR	β2GPI %	GMP140 %
1	F/27	X		X			7.13	1.89
2	F/33		X			X	15.31	2.00
3	F/25	X	X				5.81	1.42
4	F/41		X	X			11.01	1.34
5	F/31		X	X		X	6.21	1.56
6	F/27	X	X				4.88	0.29
7	F/32		X			X	1.53	34.9
<b>LEG+ SAF</b>								
1	F/33	X	X				7.06	41.96
2	F/37	X			X	X	19.59	45.94
3	F/26			X	X		2.78	1.34
4	F/30			X		X	2.70	17.88
5	F/53	X		X			6.88	1.31
6	F/33	X			X		3.95	6.6
7	F/27			X		X	2.14	1.04
8	F/23	X		X	X		7.71	1.6
9	M/45			X	X		1.23	9.31
10	F/35	X			X		1.70	4.83
11	F/25		X		X	X	1.86	2.33
12	F/26	X				X	5.74	3.97
13	F/32			X	X	X	3.65	0.57
14ç	F/35	X		X		X	4.56	3.5
15ç	F/30	X	X				6.8	2.53
16ç	F/36	X				X	4.3	3.2

**Tabla 6. Caracterización clínica de los pacientes incluidos.** TrV: Trombosis venosas de repetición, PFR: Pérdida fetal recurrente, TCP: Trombocitopenia, LR: Líneo reticulans, AH: Anemia hemolítica autoinmune  
 (ç) Pacientes con evento trombotico reciente  
 Las cifras de β2GPI y GMP140 representan el porcentaje de fluorescencia en los estudios de citometría de flujo

## IX. DISCUSION

Nuestros resultados muestran que la  $\beta$ 2GPI se une preferentemente a la membrana de plaquetas activadas y ello es determinante en la unión de aFL a las mismas.

En 1980 Schousboe <sup>119</sup> valoró la unión de  $\beta$ 2GPI marcada a plaquetas lavadas estimuladas con trombina sin embargo, no determinó el estado de activación plaquetaria ni el uso de otros agonistas, la misma autora en estudios posteriores demostró que la unión de la  $\beta$ 2GPI a plaquetas se relaciona con la actividad de adenilato ciclasa (lo cual es un dato indirecto de activación) e inhibe la activación por contacto <sup>116</sup>, Nimpf en 1986 reportó la inhibición de la actividad de protrombinasa de plaquetas activadas al agregarles  $\beta$ 2GPI <sup>96</sup>. Hasta la fecha, no había sido reportado la unión de la proteína a membrana plaquetaria por citometría de flujo ni valorando estrictamente que dichas plaquetas se encuentren activadas.

Mostramos mayor unión de aFL a plaquetas activadas que a plaquetas en reposo en presencia de  $\beta$ 2GPI, sin embargo también hay una proporción de aFL que se unen de la misma manera pero en ausencia de  $\beta$ 2GPI.

La unión de aFL a plaquetas ha sido valorada anteriormente por varios autores, sin embargo los resultados previos son contradictorios por varias razones: a) aFL utilizados. Algunos autores utilizaron aCL humanos, otros aFL monoclonales, anticuerpos murinos y/o humanos, sueros aFL positivos y rara vez anticuerpos purificados. anticuerpos con actividad de anticoagulante lúpico no siempre obtenidos de pacientes con SAF. b) Estado de las plaquetas. Algunos trabajos se realizaron con plaquetas lavadas, c

activadas con diversos agonistas, en la mayor parte de los trabajos utilizaron trombina sola o en combinación con colágena y en un estudio además fibronectina . c) Valoración de la activación. Los datos son variables y se han realizado desde estudios morfológicos por microscopía electrónica, valoración por citometría de flujo al igual que nosotros, hasta estudios funcionales como agregometrías como medida indirecta de activación plaquetaria.

Algunos autores incluso han propuesto que los aFL se unen a plaquetas en "reposo" y que son un estímulo para la activación plaquetaria pero no valoraron si las plaquetas en reposo efectivamente lo estaban, ya que se sabe que el manejo del laboratorio como la centrifugación y los lavados son capaces de activarlas. En dichos estudios hechos en su mayor parte antes de 1992, no se evaluó una fuente exógena de  $\beta$ 2GPI en los ensayos 45,46,51,111,122

Nosotros determinamos el estado de activación o reposo de las plaquetas mediante la expresión de GMP140 (CD62<sup>89,90</sup>), la cual se considera un parámetro adecuado de activación.

Los aFL utilizados los obtuvimos del plasma de pacientes con SAFP que tenían en ese momento títulos altos de aFL por ELISA, debido a lo reportado anteriormente en estos pacientes, era de esperarse que entre los anticuerpos purificados hubiera una mayor proporción de aFL que reconocen el complejo aFL- $\beta$ 2GPI<sup>22</sup>.

Los aFL son una gran familia heterogénea de anticuerpos que pueden coexistir en un mismo paciente, aunque tiende a predominar anticuerpos de alguna reactividad, podemos encontrar anticuerpos que reaccionan con CL, con actividad de anticoagulante lúpico, con otras reactividades ya sea con otros fosfolípidos aniónicos o con fosfolípidos neutros y que requieren o no de la presencia de cofactores para su reactividad ya sea  $\beta$ 2GPI, protrombina o tal vez otros <sup>4,13,22,44,61,77,123,131</sup>

Nuestros resultados confirman que los aFL purificados de pacientes con SAFP reaccionaron predominantemente con FLs aniónicos de las plaquetas activadas en presencia de  $\beta$ 2GPI. En un trabajo previo los autores evaluaron el efecto de aFL y  $\beta$ 2GPI al agregarlos a plaquetas y microvesículas estimuladas con A23187, el efecto lo determinaron por la capacidad de los aFL para prolongar los tiempos de coagulación; definieron dos tipos de aFL como A y B, los primeros con capacidad de prolongar los tiempos de coagulación en presencia de  $\beta$ 2GPI. a diferencia de los aFL tipo B <sup>45</sup>, estos últimos son aFL "puros", al parecer los mismos que encontramos en nuestro trabajo.

Determinamos directamente la unión de los aFL a la membrana plaquetaria y su dependencia de  $\beta$ 2GPI, sin saber la repercusión de ello desde el punto de vista funcional. En 1993, Shi reportó que los aCL marcados con <sup>125</sup>I se unían preferentemente a plaquetas activadas con trombina en presencia de  $\beta$ 2GPI y que los anticuerpos con actividad de ACL también marcados se unían también a plaquetas activadas sin necesidad de la  $\beta$ 2GPI; además de que dicha unión no tenía repercusiones funcionales

específicamente sobre la liberación de serotonina/tromboglobulina y sobre la agregación plaquetaria <sup>122</sup>.

En nuestro trabajo una pequeña proporción de aFL que reaccionó con plaquetas activadas (FLs aniónicos) en ausencia de  $\beta$ 2GPI exógena, lo cual podría explicarse al menos de 3 maneras: a) La presencia en estos pacientes de aFL "auténticos" de isotipo IgG que reconocen FLs aniónicos. b) La unión de aFL a plaquetas a través de Fc, ya que se ha mostrado () que al momento de activación plaquetaria aumenta el número de receptores Fc; esta posibilidad no parece ser la causa, ya que al agregar un anticuerpo irrelevante (anti-CD3) marcado a plaquetas activadas y en reposo no encontramos diferencia entre estas (datos no mostrados). c) La  $\beta$ 2GPI podría estar unida a la membrana plaquetaria in vivo y los aFL dirigidos contra  $\beta$ 2GPI-FLs podrían pues interactuar con el complejo sin necesidad de agregar  $\beta$ 2GPI exógena sin embargo, como comentaremos posteriormente, no encontramos mayor cantidad de  $\beta$ 2GPI unida ex vivo a membrana plaquetaria.

El uso de A23187 + trombina como agonistas es el estímulo más importante para la expresión de fosfolípidos aniónicos, particularmente FTS en la superficie externa de las plaquetas y para la formación de microvesículas ricas también en FTS, ambas superficies aniónicas tienen actividad de protrombinasa, son por tanto superficies procoagulantes a las cuales se une con facilidad la  $\beta$ 2GPI <sup>12,45,122,136</sup> y en presencia de ésta los aFL.

Nuestro estudio no valoró esta actividad de protrombinasa pero a través de citometría de flujo mostramos la unión de ambos a plaquetas activadas con estos agonistas y aunque no valoramos la unión a microvesículas es esperable que suceda lo mismo, de tal manera que:

Fisiológicamente, las plaquetas circulantes que reciben el estímulo suficiente generan superficies procoagulantes en las plaquetas y microvesículas. la  $\beta$ 2GPI se une a estas superficies para neutralizar el efecto procoagulante pero en presencia de aFL éstos pueden interactuar con los FLs- $\beta$ 2GPI inhibiendo o favoreciendo la actividad anticoagulante de la  $\beta$ 2GPI, o sin ningún efecto directo pero favoreciendo la destrucción plaquetaria en el bazo y por tanto tal vez asociados con la trombocitopenia que se observa en estos pacientes.

Los anticuerpos anti- $\beta$ 2GPI puros. se unen a la proteína y probablemente impiden su actividad como anticoagulante natural.

Recientemente se describió la asociación de anticuerpos anti- $\beta$ 2GPI con fenómenos trombóticos en pacientes con SAF, éstos anticuerpos son anticuerpos dirigidos únicamente contra la proteína, en general sin reactividad con FLs y que podrían definitivamente estar mas directamente relacionados que los aFL solos o aFL- $\beta$ 2GPI en la patogenia de los eventos trombóticos que caracterizan al SAF <sup>23,109,110,132</sup>.

En condiciones fisiológicas en un sujeto se encuentran plaquetas en reposo y  $\beta$ 2GPI circulantes. los pacientes con SAF tienen además aFL en el suero, en el momento en que

hay un estímulo suficiente para la activación plaquetaria (por ejemplo: daño endotelial), se desencadena el mecanismo plaquetas activadas-uni6n de  $\beta$ 2GPI-uni6n aFL. Por lo anterior, decidimos estudiar si en pacientes con SAF se encuentra un mayor porcentaje de plaquetas activadas "ex vivo" y mayor cantidad de  $\beta$ 2GPI unida a la membrana de las mismas a trav6s de citometr6a de flujo y utilizando anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ 2GPI.

Sin embargo, no encontramos mayor n6mero de plaquetas activadas ni mayor cantidad de  $\beta$ 2GPI unida a ellas en los pacientes con SAF al compararlos con un grupo de sujetos sanos, incluso cuando estudiamos pacientes con fen6menos tromb6ticos agudos.

Es posible, como se mencion6 anteriormente, que las plaquetas activadas a las cuales se unen r6pidamente la  $\beta$ 2GPI (y los aFL) sean r6pidamente eliminadas de la circulaci6n durante su paso a trav6s del bazo, sin embargo eso no puede mostrarse por el momento. Otra posibilidad es que dicho evento no sea el determinante para la presencia de trombosis. Por otra parte, sabemos que la  $\beta$ 2GPI no es el 6nico anticoagulante natural, ni el 6nico cofactor de los aFL, que los pacientes descritos con deficiencia casi completa de la  $\beta$ 2GPI son asintom6ticos, que los pacientes con SAF y LEG tienen otros mecanismos asociados y no con aFL que pueden ocasionar trombosis y trombocitopenia. Por lo tanto es a6n dif6cil determinar el valor exacto que tiene la interacci6n de  $\beta$ 2GPI-aFL-plaquetas para explicar las manifestaciones cl6nicas de 6stos pacientes<sup>40,50,78,80,99,101,112,113,114,130</sup>.

La gran afinidad de la  $\beta$ 2GPI por fosfol6pidos de membrana se muestra una vez m6s



cuando al igual que nosotros, diversos autores <sup>49,104</sup> han inmunizado ratones con la proteína pura y han obtenido anticuerpos con capacidad de reaccionar en forma variable con la proteína y fosfolípidos aniónicos. Aunque son varias las posibles explicaciones, se ha probado si las proteínas con que se inmunizan los ratones tiene rastros de FLs, si existe diferencia utilizando otros adyuvantes que no tengan FLs y el resultado ha sido el mismo, al parecer la proteína inyectada se une rápidamente a la membrana de las células y la respuesta inmune se desencadena contra ambas como un modelo de acarreador-hapteno <sup>104</sup>.

Los ACM que obtuvimos tuvieron reactividad contra la  $\beta$ 2GPI sin embargo, no nos fue posible obtener curvas de inhibición cuando se utilizó la proteína por sí sola ni con fosfolípidos, tanto en ensayos de inhibición en fase líquida como en fase sólida. Esto ya ha sido reportado por diversos autores los cuales no han podido inhibir los anticuerpos utilizando la proteína en fase líquida y recientemente se reportó inhibición al preincubar la proteína con micelas de fosfolípidos, lo cual probablemente indique que para algunos anticuerpos  $\alpha\beta$ 2GPI se requiera no solo la presencia de ambos ( $\beta$ 2GPI-FLs), sino que es importante el estado físico de los FLs <sup>94,110</sup>.

Hay en los pacientes con SAF un gran número de factores in vivo que están interrelacionados constantemente:  $\beta$ 2GPI circulante, plaquetas en reposo, endotelio íntegro, anticuerpos  $\alpha\beta$ 2GPI,  $\alpha$ FL/ $\beta$ 2GPI,  $\alpha$ FL, anti-protrombina y otros. probablemente

en algún momento este equilibrio se pierde, al parecer por un evento aún no determinado que activa a las plaquetas las cuales responden de manera normal, nuestros resultados muestran que las plaquetas de nuestros pacientes se comportan al igual que las de los sanos ante diversos agonistas y en cuanto a la translocación de fosfolípidos de membrana.

Dado este panorama, parece claro que la  $\beta$ 2GPI se une a plaquetas activadas específicamente cuando hay mayor expresión de FTS. La interrelación plaquetas activadas  $\beta$ 2GPI-aFL podría tener efecto anticoagulante, procoagulante o ningún efecto directo, es posible que la unión de  $\beta$ 2GPI y aFL a plaquetas activadas favorezca su destrucción posterior, ya que no pueden encontrarse en la circulación durante el evento trombótico agudo y finalmente no está aún bien definido si la interacción de estos factores sea determinante en las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con SAF.

## ANEXO I.

### Soluciones y amortiguadores utilizados.

#### Amortiguador de tanque 10X

144.2g glicina

30.3g trisma base

10 g SDS

Disolver en 800 ml de agua bidestilada

Aforar a un litro

Almacenar a temperatura ambiente

El pH debe ser 8.3, sin necesidad de ajuste

#### Amortiguador de muestras

2.5 ml de Tris-HCl pH 8.8, 1.25M

1.0 g SDS

2.5 ml 2 mercaptoetanol

5.8 ml glicerol (87%)

5 mg bromofenol

35 ml agua bidestilada

Agitar hasta que se hayan disueltos.

Aforar a 50ml, almacenar a -20°C

#### Amortiguador tris pH 8.8, 1.25M

37.8 g Trisma base

Disolver en 150 ml agua bidestilada

Ajustar a pH 8.8 con HCl 5N

Almacenar a 4°C

#### Amortiguador tris pH 8.8, 1.675M

5.6 g Trisma base

Disolver en 150 ml de agua bidestilada

Ajustar a pH 8.8 con HCl 5N

Almacenar a 4°C.

#### Solución de acrilamida stock

29.1 g acrilamida

0.8 g NN metil-bisacrilamida

Disolver en 60ml de agua bidestilada

Aforar a 100 ml

Guardar a 4°C, cubierto de la luz.

#### SDS 10%

10 g SDS

Disolver en 85 ml de agua bidestilada

Aforar a 100 ml

Almacenar a temperatura ambiente

#### Persulfato de amonio al 10%

0.5 g de Persulfato de amonio

Disolver en 4 ml de agua bidestilada

Aforar a 5 ml.

Almacenar a 4°C

#### Tinción de cobre

2.56 g Cloruro de cobre

50 ml de agua bidestilada

Amortiguador de transferencia  
20 % Metanol 600 ml  
0.182 M glicina 43.2 g  
0.025 M Tris-base 9.08 g  
Disolver  
Aforar a 3 litros con agua bidstilada  
Guardar a 4°C, no requiere ajuste de pH

Revelador  
Tris buffer 0.05M pH 8.8  
Naftol AS-MX fosfato 1mg/ml  
Fast Red TR salt 2mg/ml

Medio suplementado  
RPMI  
Suero bovino fetal libre de gammaglobulinas al 10%  
Penicilina-estreptomicina 1%  
Glutamina 1%  
β-mercaptoetanol 1.2%

Mezcla de congelación  
RPMI  
Suero bovino fetal 10%  
DMSO 10%

Medio suplementado + Anfotericina B  
RPMI suplementado  
Anfotericina B 0.25 µg/ml.

HAT  
RPMI  
Suero bovino fetal 10%  
β-mercaptoetanol 1.2%  
Penicilina-estreptomicina 1%  
Glutamina 1%  
Hipoxantina 0.1 mM  
Timidina 0.016 mM  
Aminopterina 0.4 µM

Amortiguador de boratos 4X  
Acido bórico 3.1 g  
Borato de Na 1.86g  
NaCl 5.85g  
H<sub>2</sub>O dd 250 ml

PBS-EDTA 1mM

Solución de boratos 4X.  
3.1 g ácido bórico  
1.86g borato de sodio  
5.84g NaCl  
250 ml agua bidestilada

Solución de glicina 0.05M pH 2.85

Columna de sefarosa-proteína A  
Resuspender sefarosa 4B activada en boratos 1X toda la noche con agitación  
Un gramo de sefarosa 4B da alrededor de 3.5ml  
Lavar 2 veces con boratos 1X a 400 rpm  
Agregar el anticuerpo (4mg/ml de sefarosa 4B)

Agitar toda la noche a 4°C  
Hacer la columna y correr con boratos  
Medir DO del eluido para corroborar la unión del anticuerpo.  
Agregar a la columna con 300 ml de glicina 0.05M en solución de boratos 1X (no ajustar pH)  
Correr la columna con 200 ml de solución de boratos  
Añadir a la columna con 4 volúmenes de glicina 0.05M pH 2.85 en agua bidestilada.  
Lavar finalmente con solución de boratos 1X.

Amortiguador de dietanolamina.  
Dietanolamina 10%  
MgCl<sub>2</sub> 0.0005M  
pH 9.8

Amortiguador de carbonatos.  
Carbonato de Na 0.25M  
NaCl 0.1 M  
pH 8

Ionóforo de calcio: 1µmol/l, CaCl<sub>2</sub> 3mmol/l

## REFERENCIAS

1. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, Sánchez-Guerrero J, Gómez-Pacheco L, Cabiedes J et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 1989; 68:353-65
2. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C et al. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within Systemic Lupus erythematosus. *Sem Arthritis Rheum* 1992; 21:275-86
3. Alarcón-Segovia D, Sánchez Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989;16:482-5
4. Alarcón-Segovia D, Cabral AR. Functional and immunochemical heterogeneity of antiphospholipid antibodies: A classification. *J Rheumatol* 1992; 19:1166-8
5. Alarcón Segovia D: Pathogenic potential of antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1988;15:890-3.
6. Alarcón-Segovia D: The pathophysiology of antiphospholipid antibodies. *Sem Clin Immunol* 1991;1:11-9.
7. Ashby B. Mechanisms of platelet activation and inhibition. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:1-1.
8. Asherson R. Anticardiolipin antibodies: Clinical associations. *Postgrad Med* 1986; 62:1081-7.
9. Berard M, Chantome R, Marcelli A, Boffa MC. Antiphosphatidyletanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies. Association with thrombosis and vascular cutaneous diseases. *J Rheumatol* (en prensa).
10. Bevers EM, Galli M. Cofactors involved in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1992; 1:51-4
11. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochem Biophys Acta* 1983;736:57-66.
12. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Platelet procoagulant activity: Physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev* 1991; 5:146-54
13. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P et al. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid bound human prothrombin. *Thromb Haemostas* 1991; 66:629-32
14. Bevers EM, Smeets EF, Comfurius P, RFA Zwaal. Physiology of membrane lipid asymmetry. *Lupus* 1994;3:235-40
15. Bingley PG, Hoffbran BI: Antiphospholipid antibody syndrome. *J Rheumatol* 1987; 80:445-8.
16. Blank M, Krauze I, Lanir N, Vardi P, Gilburd B, Tincani A, Tomer Y, Shoenfeld Y. Transfer of experimental antiphospholipid syndrome by bone marrow cell transplantation. *Arthritis and Rheum* 1995; 38:115-22

17. Boffa MC, Berard M, Sugi T, McIntyre JA. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies detected by ELISA: kininogen reactivity. *J Rheumatol* (en prensa)
18. Bonfa E, Llovet R, Scheinberg M, de Souza JM, Elkou KB. Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. *Clin Exp Immunol* 1987; 70:529-37
19. Borchman D, Harris EN, Pierangeli SS, Lamba OP. Interactions and molecular structure of cardiolipin and  $\beta 2$  glycoprotein I. *Clin Exp Immunol* 1995;102:373-8
20. Campbell AM. en "Monoclonal antibody technology" Elsevier Science Publishers BV, Holanda, 3a Impresión, 1986.
21. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón Segovia D. Detection of anticardiolipin antibodies in heat inactivated normal human sera is not influenced by  $\beta 2$  glycoprotein I. *Thrombos Res* 1993;72:471-2.
22. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón Segovia D, Sánchez Guerrero J. Phospholipid specificity and requirement of  $\beta 2$  glycoprotein I for reactivity of antibodies from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity* 1992; 5:787-801
23. Cabral AR, Rodríguez M, Cabiedes J, Alarcón Segovia D. Antibodies to  $\beta 2$  glycoprotein I associate with antiphospholipid syndrome whether primary or secondary to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (resumen) 1993; 36:S242.
24. Canoso RT, Sise HS. Chlorpromazine induced lupus anticoagulant and associated immunologic abnormalities. *Am J Hematol* 1982;13:121-9.
25. Canoso RT, Oliviera RM. Chlorpromazine induced anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant: Absence of thrombosis. *Am J Hematol* 1988; 27:272-5.
26. Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS. Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies. *Thromb Res* 1991; 61:291-99.
27. Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC. Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest.* 1977; 60:866-73
28. Cheng HM, Sam CK. Antibodies to glycosaminoglycans and cardiolipin in patients with chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 1989;72:594
29. Chonn A, Semple SC, Cullis PR.  $\beta 2$  glycoprotein I is a major protein associated with very rapid cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles. *J Biol Chem* 1995;270:25845-49.
30. Colaco CB, Mackie IJ, Irving W, Machin SJ. Anticardiolipin antibodies in viral infection. *Lancet* 1989;1:622.
31. Cooper MR, Cohen HJ, Huntley CC, Waite BM, Spees L, Spurr CL. A monoclonal IgM with antibodylike specificity for phospholipids in a patient with lymphoma. *Blood* 1974;43:493-503.
32. Cornfurius P, Senden JMG, Tilly RHJ, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RFA. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochem*

49. Gharavi AE, Sammartiano LR, Wen J, Elkon KB. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with  $\beta$ 2GPI. *J Clin Invest* 1992;90:1105
50. Ginsberg JS, Demers C, Brill-Edwards P, Hohnston M et al. Increased thrombin generation and activity in patients with systemic lupus erythematosus and anticardiolipin antibodies: Evidence for a prothrombotic state. *Blood* 1993;81:2958-63.
51. Haga HJ, Christopoulos C, Machin SJ et al. Lack of specific binding of anticardiolipin antibodies to intact platelets. *Lupus* 1992;1:387-900.
52. Hagihara Y, Goto Y, Yoshimura T. Role of the N- and C-terminal domains of bovine  $\beta$ 2 glycoprotein I in its interaction with cardiolipin. *J Biochem* 1995;118:125-36
53. Harlos E, Lande D. En "Antibodies. A laboratory manual" 1988 capítulo 6. Cold Spring Harbor Laboratory Publications. Págs 139-244
54. Harris EN. Crossreactivity of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985;16:1-6
55. Harris EN, Gharavi AE, Hughes G: Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985: 11:591-609.
56. Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD, Hughes GRV. Use of an enzyme linked immunosorbent assay and of inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis and autoimmune disorders. *J Infect Dis* 1988; 157:23-31
57. Haselaar P, Derksen RHMW, Bloksij L, de Groot PG: Crossreactivity of antibodies directed against cardiolipin, DNA, endothelial cells and blood platelets. *Thromb Hemostas* 1990;63:169-73.
58. Holmsen H. The platelet: Its membrane physiology and biochemistry. *Clin Hematol* 1972; 1:235-66
59. Hughes GRV. The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1985;3:285-6.
60. Hughes G, Harris EN, Gharavi A: The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13:486-9.
61. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid- $\beta$ 2 GPI complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992; 1:75-82.
62. Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of  $\beta$ 2 glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc. Natl Acad Sci* 1993;90:2141-5
63. 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
64. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GRV.  $\beta$ 2 glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37:1453-61.
65. Intrator L, Oksenhendler E, Desforjes L. Anticardiolipin antibodies in HIV infected patients with or without immune thrombocytopenic purpura. *Br J Hematol* 1987; 68:259



49. Gharavi AE, Sammartiano LR, Wen J, Elkon KB. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with  $\beta$ 2GPI. *J Clin Invest* 1992;90:1105
50. Ginsberg JS, Demers C, Brill-Edwards P, Hohnston M et al. Increased thrombin generation and activity in patients with systemic lupus erythematosus and anticardiolipin antibodies: Evidence for a prothrombotic state. *Blood* 1993;81:2958-63.
51. Haga HJ, Christopoulos C, Machin SJ et al. Lack of specific binding of anticardiolipin antibodies to intact platelets. *Lupus* 1992;1:387-900.
52. Hagihara Y, Goto Y, Yoshimura T. Role of the N- and C-terminal domains of bovine  $\beta$ 2 glycoprotein I in its interaction with cardiolipin. *J Biochem* 1995;118:129-36
53. Harlos E, Lande D. En "Antibodies. A laboratory manual" 1988 capítulo 6. Cold Spring Harbor Laboratory Publications. Págs 139-244
54. Harris EN. Crossreactivity of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985;16:1-6
55. Harris EN, Gharavi AE, Hughes G: Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985; 11:591-609.
56. 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
57. Haselaar P, Derksen RHMW, Blokslj L, de Groot PG: Crossreactivity of antibodies directed against cardiolipin, DNA, endothelial cells and blood platelets. *Thromb Hemostas* 1990;63:169-73.
58. Holmsen H. The platelet: its membrane, physiology, and biochemistry. *Clin Hematol* 1972; 1:235-66
59. Hughes GRV. The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1985;3:285-6.
60. Hughes G, Harris EN, Gharavi A: The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13:486-9.
61. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid- $\beta$ 2 GPI complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992; 1:75-82.
62. Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of  $\beta$ 2 glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc. Natl Acad Sci* 1993;90:2141-5
63. 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
64. Ichikawa K, Khamashta MA, Kolke T, Matsuura E, Hughes GRV.  $\beta$ 2 glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37:1453-61.
65. Intrator L, Oksenhendler E, Desforges L. Anticardiolipin antibodies in HIV infected patients with or without immune thrombocytopenic purpura. *Br J Hematol* 1987; 68:269

66. Johnstone A, Thorpe R. En "Immunochemistry in practice" 2a edición 1988, Blackwell Scientific Publications. Págs 30-47
67. Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn Y. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med* 1992;119:334-45
68. Kamboh MI, Ferrell RE, Sephernia G. Genetic studies of human apolipoproteins IV. Structural heterogeneity of apolipoprotein H. *Am J Hum Genet* 1988;42:452-7
69. Kandiah DA, Krilis SA. Beta-2 glycoprotein I. *Lupus* 1994;3:207-12
70. Kato H, Enjyoji K. Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine  $\beta$ 2 glycoprotein I: The presence of five sushi domains. *Biochemistry* 1991; 30:11657-94.
71. Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6:329-57.
72. Koike T. Anticardiolipin antibodies and  $\beta$ 2 glycoprotein I. *Clinical Immunol Immunopathol* 1994;72:187-92.
73. Kouts S, Bunn CL, Steinkasserer A, Krilis S. Expression of human recombinant  $\beta$ 2 glycoprotein I with anticardiolipin antibody cofactor activity. *FEBS letters* 1993;326:105-8
74. Kroll J, Larsen JK, Loft H, Ezban M, Wallevik, Faber M. DNA-binding proteins in Yoshida ascitis tumor fluid. *Biochem Biophys Acta* 1976; 434:490-51.
75. Kronick MN. The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *J Immunol Meth* 1986;92:1-13.
76. Lauer SA, Hempel U, Gries A, Frank KH. Amino acid sequence of the region of  $\beta$ 2 glycoprotein I which mediated binding of autoantibodies to the cardiolipin-gp1 complex in humans. *Immunology* 1993;80:22-28.
77. Layton GT, Johnston SC, Bertwistle NG. Serum factors affecting the specificity of anticardiolipin antibodies. *Immunol Cell Biol* 1991;69:17-25
78. Lahita RG, Rivkin E, Cavanagh I, Romano P. Low levels of total cholesterol, high density lipoprotein and apolipoprotein A1 in association with anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:1566-74
79. Lee NS, Brewé B, Osborne JC.  $\beta$ 2 glycoprotein I. Molecular properties of an unusual apolipoprotein, apolipoprotein H. *J Biol Chem* 1983;258:4765-4770
80. Lellouche F, Martinuzzo M, Said P, Maclouf J et al. Imbalance of thromboxane/prostacyclin biosyntheses in patients with lupus anticoagulant. *Blood* 1991;78:2894-9
81. 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.
82. Loizou SI, McCrea JD, Rudge AC et al. Measurement of anticardiolipin antibodies by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) standardization and quantitation of results. *Clin Exp*

- Immunol 1985; 52:738-45.
83. Loizou S, Mackworth Young CG, Cofine C, Walport MJ. Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipid of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus and with syphilis. *Clin Exp Immunol* 1990;80:171.
  84. Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma  $\beta$ 2 glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81:3640-44.
  85. MackWorth Young C. Antiphospholipid antibodies: More than just a disease marker? *Immunol Today* 1990;11:60-65
  86. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, Pange PJE, Goudevenos J, Moutsopoulos HM. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 1987;69:557-65.
  87. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Yasuda T, Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J Immunol* 1992;148 (12):
  88. Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Yasuda T, Koike T. Molecular definition of human  $\beta$ 2 glycoprotein I ( $\beta$ 2 GPI) by cDNA cloning and inter-species differences of  $\beta$ 2 GPI in alteration of anticardiolipin binding. *Int Immunol* 1991; 3:1217-21
  89. Mc Ever RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein bind only to activated platelets. *J Biol Chem* 1984; 259:9799
  90. Mc Ever RP. The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:87-105
  91. McNeil HF, Chesterman CN, Krilis SA. Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br J Hematol* 1989; 73: 506-13
  92. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2 glycoprotein I (apo H). *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:4120-24
  93. McNeil HP, Krilis SA, Chesterman CN. Purification of antiphospholipid antibodies using a new affinity method. *Thromb Res* 1988; 52:641-8
  94. McNeil P, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991; 49:193-280
  95. Misra R, Venables PJW, Watkins RPF, Maini RN. Autoimmunity to cardiolipin in infectious mononucleosis. *Lancet* 1987; 2:629.
  96. Nimpf J, Bevers EM, Bomans PH, Till U, Wurm H et al. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by  $\beta$ 2 glycoprotein I. *Biochem Biophys Acta* 1986;884:142.
  97. Ogasawara M, Aoki K, Matsuura E, Kunimatsu M, Ohkubo I, Galli M, Sasaki M, Yagami Y. Anticardiolipin antibodies in patients with pregnancy loss induce factor Xa production in the presence of  $\beta$ 2 glycoprotein I. *AJRI* 1995;34:269-73

98. Oi VT, Glazer AN, Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J Cell Biol* 1982; 93:961-6.
99. Oostin JD, Derksen RHWM, Hackeng TM, van Vliet M et al. In vitro studies of antiphospholipid antibodies and its cofactor,  $\beta_2$  glycoprotein I, show negligible effects on endothelial cell mediated protein C activation. *Thromb Haemostas* 1991;66:666-71
100. Ordi J, Selva A, Monegal F, Porcel JM et al. Anticardiolipin antibodies and dependence of a serum cofactor. A mechanism of thrombosis. *J Rheumatol* 1993;20:1321-4
101. Out HJ, de Groot PG, van Vliet M, de Gast GC et al. Antibodies to platelets in patients with antiphospholipid antibodies. *Blood* 1991; 77:26559.
102. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanisms of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood* 1987; 70:69-76.
103. 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.
104. Pierangeli SS, Haris EN. Induction of phospholipid binding antibodies in mice and rabbits by immunization with human  $\beta_2$  glycoprotein I or anticardiolipin antibodies alone. *Clin Exp Immunol* 1993;93:269-72.
105. Polz E, Kostner GM. The binding of  $\beta_2$  glycoprotein I to human serum lipoproteins. *FEBS letters* 1979; 102:183-6.
106. Polz E, Kostner GM. Binding of  $\beta_2$  glycoprotein I to intralipid: Determination of the dissociation constant. *Biochem Biophys Res Comm* 1979;90:1305-12.
107. Reid KBM, Day AJ. Structure function relationship of the complement components. *Immunol Today* 1989;10:177-80
108. Roubey RA, Pratt CW, Buyon JP, Winfield JB. Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon  $\beta_2$  glycoprotein I. *J Clin Invest* 1992;90:1100-4
109. Roubey RAS, Eisenberg RA, Harper MF, Winfield JB. Anticardiolipin antibodies recognize  $\beta_2$ GP1 in the absence of phospholipid. *J Immunol* 1995;154:954-60
110. Roubey RAS, Eisenberg Ra, Winfield JB. Autoantibodies to  $\beta_2$  glycoprotein I: The role of antibody affinity and antigen density. *Lupus (resumen)* 1994;34:314
111. Rote NS, Ng AK, Dostal Johnson DA et al. Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin induced platelet activation. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 66:193-200
112. Ruiz-Argüelles G, Ruiz-Argüelles A, Delezé M, Alarcón-Segovia D. Acquired protein C deficiency in a patient with primary antiphospholipid syndrome. Relationship to reactivity of anticardiolipin antibody with thrombomodulin. *J Rheumatol* 1989;16:381-3
113. Ruíz-Argüelles A, Vázquez-Prado J, Delezé M, Perez Romano Beatriz et al. Presence of serum antibodies to coagulation protein C in patients with systemic lupus erythematosus is not associated with antigenic or functional protein C deficiencies. *Am J Hematol* 1993;44:58-9

114. Ruíz-Argüelles GJ, Ruíz-Argüelles A, Alarcón-Segovia D, Drenkard C et al. Natural anticoagulants in systemic lupus erythematosus. Deficiency of protein S bound to C4bp associates with recent history of venous thromboses, antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1991;18:552.
115. Sammaritano LR, Locksin MD, Gharavi AE. Antiphospholipid antibodies differ in antiphospholipid cofactor requirement. *Lupus* 1992; 1:83-90
116. Schousboe I. Effect of  $\beta 2$  glycoprotein I on the activity of adenylate cyclase in platelet membranes. *Thromb Res* 1983;32:291-9.
117. Schousboe I. Characterization of subfractions of  $\beta 2$  glycoprotein I: Evidence of sialic acid microheterogeneity. *Int J Biochem* 1984;15:35.
118. Schousboe I.  $\beta 2$  glycoprotein I : A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985;66:1086-91.
119. Schousboe I. Binding of  $\beta 2$  glycoprotein I to platelets: Effect of adenylate cyclase activity. *Thromb Res* 1980; 19:225-37
120. Schultze HE, Heremans JF. en "Molecular biology of human proteins". 1966, Elsevier Publishing Company págs 220, 224, 225, 285.
121. Sephemia B, Kamboh MI, Adams, Campbell LL, Bunker CH et al. Genetic studies of human apolipoproteins . *Human Genet* 1989;82:118-22.
122. Shi W, Chong BH, Chesterman CN.  $\beta 2$  glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus anticoagulants. *Blood* 1993;81:1255-62.
123. Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize kininogen-PE complex. *Blood* 1995;86:3083-9.
124. Sunne A, Bette-Bobillo P, Vienvenue A, Fellman P, Devaux PF. Selective outside-inside translocation of aminophospholipids in human platelets. *Biochemistry* 1987; 26:2972-8
125. Tan EM, Cohes AS, Fies JF et al. The 1982 revised criteria for the classification of Systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7
126. Tans G, Rosing J, Thomassen CLGD, Heeb MJ et al. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet derived microparticles. *Blood* 1991; 77:2641-8
127. Tilly RHJ, Senden JMG, Comfurius P, Vevers EM, Zqaal RFA. Increased aminotranslocase activity in human platelets during secretion. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1029:188-90
128. Triplett DA, Brandt J. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. *Br J Hematol* 1989; 73:139-42.
129. Vaarala O, Palosuo T, Kleermola M, Aho K. Anticardiolipin response in acute infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 41:8-15.

130. Vaarala O, Althan G, Jauhainen M, Lerislao-Repo M et al. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993;341:923-5.
131. Verrier Jones J, James H, Tan MH, Mansour M. Antiphospholipid antibodies require  $\beta$ 2 glycoprotein I (apolipoprotein H) as cofactor. *J Rheumatol* 1992;19:1397-402.
132. Viard Amoura Z, Bach JF. Association of anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992;93:181-6.
133. Wagencnecht D, McIntyre JA. Changes in  $\beta$ 2 glycoprotein I antigenicity induced by phospholipid binding. *Thromb Haemostas* 1993;69:361-5
134. Watson SS, Hableton S. Phosphorylation dependent and independent pathways of platelet aggregation. *Biochem J* 1989; 258:479-85
135. Wurm HI, Beubler E, Polx E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of  $\beta$ 2 glycoprotein I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982;31:484-6.
136. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochem Biophys Acta* 1992;1180:1-8.