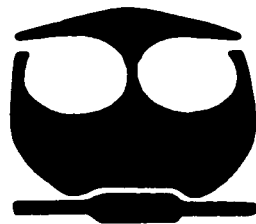




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**



**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA  
 $\beta_2$ -GLICOPROTEÍNA-I EN LA POSICIÓN 247 EN  
PACIENTES MEXICANOS CON LOS SÍNDROMES  
ANTI-FOSFOLÍPIDO O ANTI-FOSFOLÍPIDO/  
COFACTOR**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO - BIÓLOGO**  
P R E S E N T A :  
**GILBERTO ALEPH PRIETO MORENO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**  
MÉXICO, D. F.



EXÁMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2002



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 esta 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.

**Paginación**

**Discontinua**

## JURADO

<b>Presidente</b>	Prof. Saturnino de León Chapa
<b>Vocal</b>	Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas
<b>Secretario</b>	Prof. Javier Cabiedes Contreras
<b>1er. Suplente</b>	Prof. Patricia Elvira Berrón Ruiz
<b>2º. Suplente</b>	Prof. Teresa de Jesús Olivera Flores

Sitio donde se desarrolló el tema:


**Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.**

Asesor



Dr. Javier Cabiedes Contreras

Sustentante



Gilberto Aleph Prieto Moreno

A mi mamá, como un homenaje a Todo ese esfuerzo y amor dedicado a sus hijos.

A mi papá que, muy a su manera, pero siempre ha estado junto a mí.

A Paola que significa tanto para mí que su presencia me ha dado los momentos más felices de mi vida.

A mi hermana Ivonne porque hubo momentos buenos y habrá mejores.

Al integrante más brillante de la familia; gracias por haberme aguantado toda tu vida Enrique.

A mis abuelos Adelina', Socorro, Francisco' y Gilberto que siempre tienen una bendición para mí.

Para Fredy, Chava y Osiris, personas con las que he crecido y compartido ideas, penas, huelgas, triunfos, chelas, derrotas, alegrías, problemas..., vida.

A mi entrenador Harbei Díaz por la confianza y amistad depositada en mí.

A Marcos' y toda la amistad inconclusa.

A todos y cada uno de mis maestros, pero en especial a las maestras María Luisa Aguilar, Teresa Blanco, Socorro Alpizar, Pilar Montagut; al Dr. Rafael Castillo, al maestro Raúl Garza y al Dr. Fernando Montiel.

A los integrantes del Laboratorio de Inmunología Humoral del INCMNSZ: Susy, Javier, Martha, Tamara, Tere, Jorge, Hugo, Ara y Haydé. Agradezco sinceramente el apoyo, los consejos, los chistes, y en general todo lo que aprendí de cada uno y los buenos momentos que pasé.

"La historia geológica nos muestra que la vida es sólo un corto episodio entre dos eternidades de muerte y que, en ese mismo episodio, el pensamiento consciente no ha durado ni durará más que un momento. El pensamiento no es más que un relámpago en medio de una noche larga. Pero este relámpago lo es todo"

Henry Poincaré

## Índice

	Pág.
1. Abreviaturas.....	0
2. Resumen.....	1
3. Introducción.....	2
4. Justificación.....	4
5. Antecedentes	
5.1. Síndrome anti-fosfolípido.....	5
5.2. Anticuerpos anti-fosfolípido.....	6
5.3. Factores proteicos asociados al SaF.....	8
5.4. Síndrome anti-fosfolípido/cofactor (SaF/C).....	10
5.5. Bioquímica de la $\beta_2$ -Glicoproteína I.....	11
5.6. Epitopos de la $\beta_2$ -Glicoproteína I.....	12
5.7. Papel fisiológico de la $\beta_2$ -Glicoproteína I.....	13
5.8. $\beta_2$ -Glicoproteína I: aspectos genéticos.....	15
5.9. Bases moleculares de los polimorfismos estructurales.....	19
5.10. Polimorfismo genético de la $\beta_2$ -Glicoproteína I y Síndrome anti-fosfolípido.....	20
6. Materiales y métodos	
6.1. Sujetos de estudio.....	24
6.2. Aislamiento del ADN genómico.....	25
6.3. PCR semi-anidada.....	26
6.4. RFLP.....	27
6.5. ELISA para anticuerpos aCL y $\alpha\beta_2$ GPI.....	30
6.6. ELISA para anticuerpos anti-cardiolipina "verdaderos".....	30
6.7. Análisis estadístico.....	31
7. Resultados	
7.1. Análisis descriptivo.....	32
7.1.1. Sujetos sanos.....	33
7.1.2. Pacientes con SaF.....	34
7.1.3. Pacientes con SaFP.....	35
7.1.4. Pacientes con SaF/CP.....	36
7.1.5. Pacientes con SaFS.....	36
7.1.6. Pacientes con SaF/CS.....	37
7.2. Análisis del polimorfismo val/leu <sup>247</sup> del gen de la $\beta_2$ GPI en los pacientes con SaF.....	38
7.3. Análisis del polimorfismo val/leu <sup>247</sup> del gen de la $\beta_2$ GPI y la producción de autoanticuerpos en el SaF.....	39
7.3.1. Anticuerpos anti-cardiolipina "verdaderos".....	40
7.3.2. Anticuerpos anti-cardiolipina dependientes de $\beta_2$ GPI (aCL)	
7.3.2.1. SaFP.....	40
7.3.2.2. SaFS.....	41
7.3.2.3. SaF/CP y SaF/CS.....	42

7.3.3. Anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI	
7.3.3.1. SaFP.....	42
7.3.3.2. SaF/CP.....	43
7.3.3.3. SaFS.....	45
7.3.3.4. SaF/CS.....	45
7.3.3.5. Variantes primarias.....	46
7.4. Análisis de la asociación del alelo V en la posición 247 del gen de la $\beta_2$ GPI con la producción de anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI de isotipo IgG.	
7.4.1. Pacientes con SaF/CP y a $\beta_2$ GPI.....	48
7.4.2. Pacientes con variantes primarias del SaF y a $\beta_2$ GPI.....	49
7.5. Polimorfismo val/leu <sup>247</sup> del gen de la $\beta_2$ GPI y manifestaciones clínicas del SaF.....	49
8. Discusión.....	52
9. Conclusiones.....	62
10. Bibliografía.....	64
11. Apéndice.....	71



## Abreviaturas

a $\beta_2$ GPI	Anticuerpos anti- $\beta_2$ -Glicoproteína I
aCL	Anticuerpos anti-cardiolipina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
aFL	Anticuerpos anti-fosfolípido
ASB	Albúmina sérica bovina
$\beta_2$ GPI	$\beta_2$ -Glicoproteína I
Bg*D	Alelo deficiente del polimorfismo cuantitativo de la $\beta_2$ GPI
Bg*N	Alelo normal del polimorfismo cuantitativo de la $\beta_2$ GPI
CL	Cardiolipina
CMV	Citomegalovirus
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
IEF	Inmunoelectroforesis
IP	Inmunoprecipitación
L	Leucina
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low density lipoprotein)
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LEG	Lupus Eritematoso Generalizado
MØ	Macrófago
OA	Oclusión arterial
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate buffer saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
RFLP	Fragmentos de restricción polimórfica (Restriction fragment length polymorphism)
RRa	Riesgo relativo aproximado
SaF	Síndrome anti-fosfolípido
SaFP	Síndrome anti-fosfolípido Primario
SaFS	Síndrome anti-fosfolípido Secundario
SaF/C	Síndrome anti-fosfolípido Cofactor
SaF/CP	Síndrome anti-fosfolípido/Cofactor Primario
SaF/CS	Síndrome anti-fosfolípido/Cofactor Secundario
SBF	Suero bovino fetal
SCR	Secuencias cortas de repetición (Short consensus repeats)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (Single nucleotide polymorphism)
TA	Temperatura ambiente (aproximadamente 20°C)
V	Valina
VDRL	Prueba para el diagnóstico de sífilis (Venereal disease research laboratories)
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

## 2. Resumen

El Síndrome anti-fosfolípido (SaF) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-fosfolípido (aFL) y eventos clínicos, como la trombosis (arterial y/o venosa), el aborto espontáneo principalmente de repetición, la muerte fetal intrauterina, la trombocitopenia y algunos trastornos neurológicos. En ausencia de datos clínicos o serológicos de otra enfermedad primaria del tejido conjuntivo se le denomina Síndrome anti-fosfolípido primario (SaFP), para distinguirlo del Síndrome anti-fosfolípido secundario (SaFS) que se presenta principalmente en pacientes con LEG. En 1990 se reportó que los aFL reconocían un complejo formado por fosfolípidos y  $\beta_2$ -glicoproteína-I ( $\beta_2$ GPI). Seis años más tarde, Cabral y colaboradores informaron de pacientes con manifestaciones de SaF y pruebas para la detección de aFL negativas pero con presencia de anticuerpos de isotipo IgG con reactividad contra  $\beta_2$ GPI humana, con lo que describieron una variante del SaF que definieron como síndrome anti-fosfolípido/cofactor, el cual puede presentarse de forma primaria (SaF/CP) o secundaria a la presencia de LEG (SaF/CS). La  $\beta_2$ GPI humana es una proteína sérica que participa en procesos de coagulación, aterogénesis y apoptosis, y además, es el principal blanco de los autoanticuerpos de pacientes con SaF. De esta proteína se han reportado cuatro polimorfismos genéticos, de los cuales uno se localiza en la posición 247, dicha posición se ubica entre el sitio de unión a fosfolípidos y uno de los posibles epítopos crípticos. El objetivo del trabajo fue estudiar la frecuencia de los alelos valina y leucina en la posición 247 del gen de la  $\beta_2$ GPI en pacientes mexicanos con SaF o SaF/C, para esclarecer su participación en la generación de los anticuerpos y las manifestaciones clínicas que caracterizan a ambos padecimientos. La metodología empleada para determinar el genotipo del polimorfismo<sup>247</sup> en 106 sujetos sanos y en 86 pacientes con SaF, fue PCR-RFLP. La cuantificación de anticuerpos séricos se realizó por ELISA. Los sujetos sanos tuvieron el siguiente patrón de distribución de frecuencias genotípicas y alélicas: VV(0.13), VL(0.52), LL(0.35) y V(0.39), L(0.61), respectivamente. De los 86 pacientes con SaF 27 estaban clasificados como SaFP, 12 como SaF/CP, 40 como SaFS y 7 como SaF/CS. No se observó diferencia significativa en ningún grupo de pacientes y los sujetos sanos. Tampoco se encontró correlación del polimorfismo val/leu<sup>247</sup> y la producción de anticuerpos anti-cardiolipina dependientes de  $\beta_2$ GPI en ninguna variante del SaF. La producción de autoanticuerpos  $\alpha\beta_2$ GP-I y la presencia de oclusión arterial en pacientes con las variantes primarias del SaF (SaFP y SaF/CP), se encontraron correlacionadas con el genotipo VV. Dichas asociaciones no se observaron en los pacientes con SaF y LEG, sugiriendo que en estos pacientes el origen de los  $\alpha\beta_2$ GP-I es distinto. De los resultados se concluye que en la muestra de sujetos mexicanos sanos el alelo silvestre del polimorfismo<sup>247</sup> del gen de la  $\beta_2$ GPI es el que codifica para leucina. En las variantes primarias del SaF, el genotipo VV del polimorfismo estudiado está involucrado con la generación de  $\beta_2$ GPI antigénica y con el riesgo de padecer oclusión arterial, confirmando así que el sistema  $\beta_2$ GPI/ $\alpha\beta_2$ GPI participa directamente en el mecanismo que genera trombosis. No obstante, es necesaria la participación de otros factores para la manifestación de dichas enfermedades.

### 3. Introducción

Actualmente, las enfermedades autoinmunes ocupan un lugar importante entre los problemas de salud ya que afectan aproximadamente al 5% de la población mundial<sup>1</sup>. Estos padecimientos, cuya prevalencia es mayor en el sexo femenino<sup>2</sup>, se presentan generalmente entre la segunda y tercera década de vida, es decir, en la etapa productiva y reproductiva de la población. La etiología de estas enfermedades es aun desconocida, sin embargo, en todas existe algo en común: una desregulación del sistema inmunológico que origina la aparición de una respuesta inmune aumentada en contra de componentes propios. Una de las enfermedades autoinmunes que se presenta con mayor frecuencia es el Lupus Eritematoso Generalizado (LEG), padecimiento que además de afectar las articulaciones y los músculos, puede dañar la piel y casi todos los órganos. Serológicamente se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que reconocen componentes del citoplasma y núcleo de entre los que destacan los anticuerpos anti-ADN de doble cadena<sup>3</sup>.

En la década de los 60's se describió la presencia de trombosis y anticoagulante Lúpico en los sueros de un grupo de pacientes con LEG<sup>4</sup>. Posteriormente, a esta nueva entidad patológica autoinmune que relacionaba la presencia de anticuerpos anti-fosfolípido (aFL) con eventos clínicos como la trombosis (arterial y/o venosa), el aborto espontáneo principalmente de repetición, la muerte fetal intrauterina, la trombocitopenia, el *livedo reticularis* y algunos trastornos neurológicos, se le dio el nombre de Síndrome anti-fosfolípido (SaF)<sup>9</sup>.

Los aFL son un marcador serológico distintivo de los pacientes con SaF. En 1990, se informó que los aFL de pacientes con SaF reconocían un complejo formado

por fosfolípidos y una proteína con afinidad por compuestos de carga negativa<sup>24,26</sup>, identificada como  $\beta_2$ -Glicoproteína I ( $\beta_2$ GPI). La participación de esta proteína en el SaF esta ampliamente documentada, de hecho, existen pacientes con manifestaciones del SaF y pruebas para la detección de aFL negativas pero con presencia de anticuerpos de isotipo IgG con reactividad contra  $\beta_2$ GPI humana. A esta variante del SaF se le denominó síndrome anti-fosfolípido/cofactor (SaF/C).

La  $\beta_2$ GPI humana es una proteína sérica que interviene en procesos de coagulación, aterogénesis y apoptosis. Ahora bien, considerando que la  $\beta_2$ GPI es el blanco principal de los aFL, es posible que cualquier alteración a nivel ADN que afecte su estructura o su concentración plasmática modifique su comportamiento en los procesos en que participa. De esta proteína se han reportado variaciones cuantitativas y cualitativas, siendo estas últimas diferencias estructurales resultado principalmente de mutaciones puntuales, es decir, de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés single nucleotide polymorphism). Hasta el momento, se han reportado 4 SNP's en el gen de la  $\beta_2$ GPI, uno de los cuales se localiza en el exón 7 del gen y corresponde a la posición 247 de la proteína. Este polimorfismo en la posición 247, cuyos posibles alelos son valina y leucina, se ubica entre la región de la  $\beta_2$ GPI que une fosfolípidos y uno de los epitopos reconocido por los aFL. Lo anterior sugiere que la mutación-247 en la  $\beta_2$ GPI probablemente sea relevante en la patogénesis del SaF, debido a que éste autoantígeno parece estar íntimamente relacionado con las manifestaciones asociadas a la presencia de los aFL autoinmunes. De lo anterior se deriva la hipótesis del presente trabajo, en la que suponemos que puede existir una relación significativa entre la variación genética, y consecuentemente estructural, producto del polimorfismo en la

posición 247 de la  $\beta_2$ GPI y la generación de los anticuerpos y las manifestaciones clínicas del SaF.

El objetivo del trabajo fue estudiar la frecuencia de los alelos valina y leucina en la posición 247 del gen de la  $\beta_2$ GPI, en pacientes mexicanos con síndrome anti-fosfolípido o anti-fosfolípido/cofactor, para esclarecer su posible papel en la generación de los autoanticuerpos y las manifestaciones clínicas que caracterizan a ambos padecimientos.

#### **4. Justificación**

La presencia de anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI ( $a\beta_2$ GPI) en los pacientes con SaF se asocia con manifestaciones clínicas, por lo que el estudio genético de la  $\beta_2$ GPI adquiere una relevancia significativa. En la actualidad, el desarrollo tecnológico y el avance en el conocimiento del genoma humano han permitido ponderar la participación del factor genético en diversos tipos de padecimientos, como son los errores innatos del metabolismo y los procesos asociados al envejecimiento. El conocer la contribución del aspecto genético en la generación de SaF, no sólo ayudará a predecir susceptibilidades en la población, sino también ayudará a comprender la etiología del padecimiento. Además, siendo esta enfermedad prototipo de autoinmunidad, comprender su etiología puede ser de gran utilidad en el estudio de otras enfermedades de la misma o similar naturaleza. Seguramente, los conocimientos generados en esta área de investigación permitirán el desarrollo de herramientas útiles en el diagnóstico y el diseño de nuevas y mejores estrategias para el tratamiento del SaF.

## 5. Antecedentes

### 5.1. Síndrome anti-fosfolípido

En 1963, Bowie *et al*<sup>4</sup> reportaron un grupo de pacientes con LEG, trombosis y presencia de anticoagulante Lúpico en el suero. Esta última característica, junto con resultados falsos positivos para la prueba de VDRL, fue observada en pacientes con síndrome vascular periférico, asociándose los dos eventos a la presencia de anticuerpos anti-fosfolípido (aFL)<sup>5</sup>. Dos décadas después, en 1983, la presencia en suero de anticuerpos que reconocían al fosfolípido cardiolipina (CL) fue detectada en un grupo de pacientes con LEG que presentaban un síndrome complejo caracterizado por trombosis, pérdida fetal recurrente, trastornos neurológicos, trombocitopenia y *livedo reticularis*<sup>6</sup>. Debido a la asociación de los anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) con las manifestaciones clínicas citadas, Hughes *et al* adoptaron el nombre de Síndrome anticardiolipina<sup>7</sup>. Sin embargo, el estudio del suero de pacientes con el síndrome reveló posteriormente que no sólo existía la presencia de aCL, sino que también era posible detectar anticuerpos capaces de reaccionar con otros fosfolípidos<sup>8</sup>. Este hallazgo condujo a cambiar el nombre propuesto en 1983 por Hughes por el de Síndrome anti-fosfolípido (SaF).

Actualmente se utiliza el término síndrome anti-fosfolípido (SaF) para definir una entidad clínica que asocia la presencia de anticuerpos anti-fosfolípido (aFL) con trombosis arteriales y/o venosas, abortos de repetición, *livedo reticularis*, trombocitopenia y trastornos neurológicos<sup>9</sup>. Aunque la asociación de estas manifestaciones clínicas con los aFL fue reportada originalmente en LEG, existen

pacientes con títulos altos de aFL y manifestaciones clínicas de la presencia de estos anticuerpos pero sin evidencias clínicas o serológicas de otra enfermedad primaria del tejido conjuntivo. A esta otra entidad clínica se le denominó síndrome anti-fosfolípido primario (SaFP) para distinguirlo del Síndrome anti-fosfolípido secundario (SaFS) o asociado que se presenta principalmente en pacientes con LEG<sup>10</sup>. Existen diferencias entre ambas entidades, debidas principalmente a la presencia de niveles mas elevados de aFL en el SaFP y a la influencia de LEG en el síndrome anti-fosfolípido secundario (SaFS)<sup>5</sup>.

En la población mexicana la prevalencia del SaF no esta determinada, su frecuencia es de aproximadamente el 10 % en pacientes con LEG<sup>11</sup> y la frecuencia de la entidad primaria aún se desconoce.

## **5.2. Anticuerpos anti-fosfolípido**

Los aFL son una familia de inmunoglobulinas que pueden estar presentes por diversas circunstancias, las principales son las siguientes: 1) pueden ser anticuerpos naturales, y evidencia de lo anterior es que todos los ratones normales<sup>12</sup> y el 85% de los sujetos de una población humana normal<sup>13</sup> tienen anticuerpos naturales contra eritrocitos tratados enzimáticamente con la tiorproteasa bromelina, el epitopo que se expone con este tratamiento es la fosfatidilcolina, fosfolípido de carga neutra localizado en la cara externa de la membrana celular. Los anticuerpos naturales se encuentran a títulos relativamente bajos, son codificados por genes de línea germinal y producidos principalmente por células B CD5<sup>+</sup> sin estímulo aparente; 2) como resultado de la intervención de factores inmunogenéticos, como lo muestra el trabajo de Asherson *et al* cuyos resultados sugieren la participación del alelo DRw53 en la generación de la

respuesta autoinmune en contra de FL. Lo anterior se fundamenta con la presencia de este alelo en todos los pacientes con SaFP con títulos altos de aCL incluidos en el estudio<sup>14</sup>; 3) como resultado de una des-regulación inmune, debido a que esta trae como consecuencia una excesiva producción de autoanticuerpos, incluyendo los aFL<sup>15</sup>. En este caso se trata de anticuerpos autoinmunes asociados con procesos patogénicos; 4) como anticuerpos anti-idiotipo de otros anticuerpos. Fundamento lo anterior en estudios que proponen que una perturbación de la red idiotipo-anti-idiotipo por un idiotipo patogénico o un anti-idiotipo puede ser un mecanismo de generación de autoanticuerpos<sup>16,17</sup>. La posibilidad de que los aFL pueden ser anti-idiotipos de otros anticuerpos emerge con el descubrimiento de la presencia de anticuerpos anti-idiotipo contra anticuerpos de cabra anti-proteína C, que también se comportan como aCL, en el suero de sujetos sanos y de pacientes con LEG<sup>18</sup>; 5) inducidos por fármacos. En algunos pacientes que reciben tratamiento con clorpromazina se han detectado títulos altos de aFL<sup>19</sup>, este fármaco puede también inducir un síndrome parecido al LEG<sup>20</sup>; 6) como resultado de procesos infecciosos, en cuyo caso su síntesis es dirigida por antígeno, son de isotipo IgG, de alta afinidad y los títulos en suero bajan cuando se controla la infección. El primer aFL reportado fue el relacionado con la sífilis, que posteriormente se usó para el diagnóstico serológico de esta enfermedad. En procesos infecciosos virales, como Hepatitis o Rubéola, también se ha podido demostrar el incremento en los títulos de aFL<sup>21</sup>.

Una propiedad inmunquímica interesante de los aFL es su reactividad cruzada, principalmente con moléculas con carga negativa como heparina, ADN nativo y de cadena simple, pudiendo extenderse dicho reconocimiento a las membranas de las plaquetas y de las células endoteliales<sup>22,23</sup>.



### 5.3. Factores proteicos asociados al SaF

1990 marca un hito en el estudio de los aFL. En este año la investigación en el campo de los aFL cambió completamente su rumbo debido a que tres grupos de investigadores, de manera casi simultánea, reportaron que el antígeno reconocido por los aFL presentes en el suero de pacientes con SaF no era el FL, sino un complejo formado por fosfolípidos aniónicos y una proteína con afinidad por estructuras de carga negativa que, de acuerdo con los autores, actuaba como cofactor en dicho reconocimiento. Esta proteína fue identificada como  $\beta_2$ -Glicoproteína I ( $\beta_2$ GPI)<sup>24-26</sup>. Estudios posteriores señalaron que los autoanticuerpos contra fosfolípidos de carga neutra también requieren de cofactores proteicos específicos, como lo demostraron Sugi *et al* en 1995. En su trabajo, dichos autores reportaron que los anticuerpos que reconocen fosfatidiletanolamina precisan para su reactividad de quinínogeno y del complejo formado por la proteína unidora de quinínogeno-quinínogeno, el cual puede incluir precalicreína y/o factor XI<sup>27</sup>. Recientemente se ha reportado que los anticuerpos anti-fosfolípido putativos reaccionan contra una importante variedad de proteínas plasmáticas como la  $\beta_2$ GPI, protrombina, proteína C, proteína S, quinínogeno, anti-trombina III<sup>3</sup> y otras proteínas que unen fosfolípidos como la anexina V<sup>28-30</sup>.

A partir de la publicación de estos hallazgos, los anticuerpos anti-cofactor se sitúan con un papel protagónico dentro del SaF. De entre los cofactores proteicos asociados con el SaF, la  $\beta_2$ GPI es el más estudiado y el que se ha encontrado con mayor frecuencia asociado al padecimiento. Uno de los fosfolípidos con el que forma el complejo antigénico es el difosfatidilglicerol, fosfolípido aniónico comúnmente conocido como cardiolipina (Figura 1). Los anticuerpos aFL se detectan mediante la técnica de

ELISA (del inglés Enzyme linked immunosorbent assay), por lo que de acuerdo a lo anterior, en un ensayo de rutina para detectar aCL, en el que se usa suero bovino fetal como agente bloqueador, la unión de los aCL a la cardiolipina en presencia de  $\beta_2$ GPI puede atribuirse a epitopos en la  $\beta_2$ GPI<sup>25</sup>, en el complejo  $\beta_2$ GPI/CL<sup>24</sup>, o al reconocimiento de epitopos crípticos en la CL<sup>31</sup> y/o en la  $\beta_2$ GPI. Utilizando espectroscopia infrarroja<sup>32</sup> y dicroísmo circular<sup>33</sup> se pudo demostrar que la interacción de la  $\beta_2$ GPI con la CL produce cambios conformacionales importantes en ambas moléculas, generando probablemente exposición de regiones crípticas. Los resultados de los estudios revelaron que las alteraciones en la molécula fosfolipídica restringen la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas, mientras que la  $\beta_2$ GPI sufre modificaciones en su estructura que disminuyen el porcentaje de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada, e incrementan la conformación azarosa, aumentando así su potencial antigénico. Esta evidencia sugiere que los epitopos crípticos detectados por los aCL se encuentran en la  $\beta_2$ GPI modificada por la unión con la cardiolipina. La exposición de este neoepitopo no sólo es el resultado de la unión con la cardiolipina, Matsuura *et al* demostraron que es posible la detección de los anticuerpos aCL en ausencia de CL utilizando en el ELISA placas de poliestireno expuestas previamente a radiación  $\gamma$ . Este tratamiento ocasiona la oxigenación de la superficie de la placa, por lo que los resultados del estudio sugieren que el cambio conformacional, y por ende la exposición del o los epitopo(s) críptico(s), en la  $\beta_2$ GPI puede originarse también por la interacción con superficies oxigenadas<sup>34</sup>.

La participación de la  $\beta_2$ GPI se puede entender mejor al diferenciar los aFL encontrados en pacientes con SaF de los encontrados en pacientes con enfermedades infecciosas como sífilis, malaria, o hepatitis A. Los aFL de estos últimos reaccionan

directamente contra cardiolipina (en ausencia de  $\beta_2$ GPI). Esta notable diferencia sugiere un papel patogénico potencial de la  $\beta_2$ GPI en el SaF.

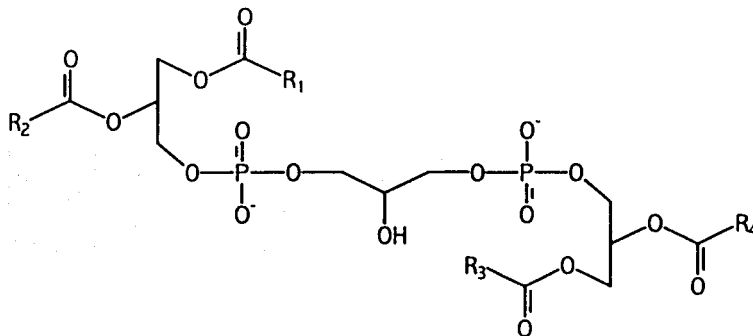


Figura 1. Difosfatidilglicerol. Glicerofosfolípido "doble" comúnmente conocido como cardiolipina debido a que se aisló por primera vez del músculo cardíaco bovino. Modificada de la Ref. 35.

#### 5.4. Síndrome anti-fosfolípido/cofactor (SaF/C)

La inducción de SaF experimental mediante la inmunización de ratones con  $\beta_2$ GPI realizada por Gharavi en 1992<sup>36</sup> suscitó la investigación de los anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI ( $\alpha\beta_2$ GPI), y tres años más tarde, Cabiedes *et al* reportaron que en pacientes con LEG, las manifestaciones trombóticas del SaF se asocian con mayor fuerza con  $\alpha\beta_2$ GPI que con aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI<sup>37</sup>. Aunado a lo anterior, en 1996 Cabral *et al* reportaron un grupo de pacientes sin evidencia de LEG, con manifestaciones clínicas del SaF y pruebas para la detección de anticuerpos aFL negativas, pero con títulos altos de anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GPI de isotipo IgG. Debido al hallazgo, los autores proponían la sustitución del término Síndrome anti-fosfolípido por el de Síndrome anti-fosfolípido/cofactor y la clasificación de los afectados por el padecimiento, en distintas

variantes del síndrome, dependiendo del antígeno reconocido por los anticuerpos presentes en el plasma de los pacientes<sup>38</sup>. Un año más tarde, se reportó el mismo fenómeno en pacientes con LEG, considerándose como la variante secundaria de la entidad anteriormente descrita<sup>39</sup>.

### **5.5. Bioquímica de la $\beta_2$ -Glicoproteína I**

La  $\beta_2$ GPI humana es una proteína sérica descrita por primera vez en 1961<sup>40</sup> y presente en sujetos sanos en una concentración de aproximadamente 200  $\mu\text{g/mL}$ . Es una proteína asociada a la fracción de las lipoproteínas, que activa a la lipoproteína lipasa por lo que también es conocida como Apolipoproteína H<sup>41,42</sup>. En lo referente a su estructura, los estudios muestran que esta constituida por una sola cadena polipeptídica de 326 aminoácidos, su peso molecular es de 50 kD y aproximadamente el 18% son carbohidratos. Se conoce la secuencia del DNA complementario y la secuencia de aminoácidos que la forman<sup>43-45</sup>. La  $\beta_2$ GPI esta organizada en cinco dominios homólogos conocidos como segmentos cortos repetidos (SCRs, del inglés short consensus repeats)<sup>46</sup>, cada uno consiste de aproximadamente 60 aminoácidos con puentes disulfuro inter- e intra-regiones<sup>47</sup>. En 1992, se identificó un sitio de unión a fosfolípidos de carga negativa en el quinto SCR (Figura 2), esta zona involucra a los aminoácidos 281-288 (CKNKEKKC)<sup>48-50</sup>. Dicha secuencia se encuentra cargada positivamente a pH fisiológico debido a su alto contenido de Lisina que es un aminoácido básico.

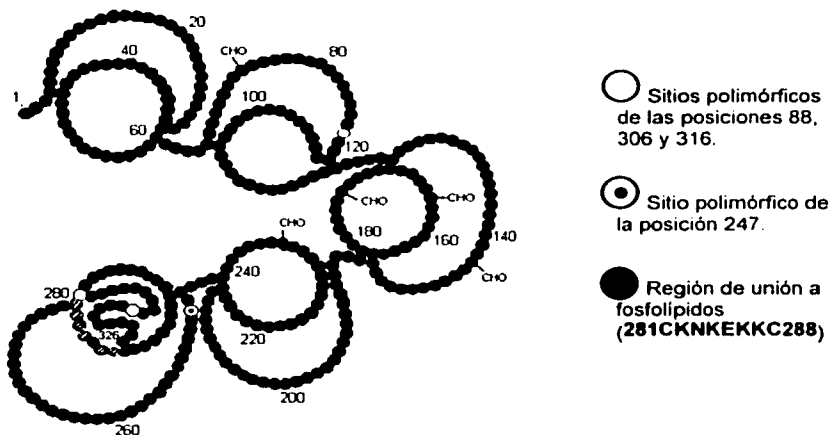


Figura 2. Estructura secundaria de la  $\beta_2$ -Glicoproteína I.

### 5.6. Epitopos de la $\beta_2$ -Glicoproteína I

A través de la expresión en fagos<sup>51</sup> y el uso de mutantes de  $\beta_2$ GPI<sup>52,53</sup>, fue posible obtener resultados que sugerían la presencia de una región reconocida por los autoanticuerpos presentes en pacientes con SaF dentro del dominio I de esta proteína. Sin embargo, en estos experimentos, la metodología empleada hace suponer que los anticuerpos detectados están dirigidos rigurosamente en contra de la  $\beta_2$ GPI, y que la presencia del fosfolípido no modifica su reconocimiento.

Por otro lado, el cuarto dominio ha sido involucrado con el sitio de reconocimiento de los aCL, es decir, con el epitopo críptico<sup>53-56</sup>. Experimentos con mutantes de  $\beta_2$ GPI muestran evidencia de lo anterior<sup>54</sup>. Además, a través del análisis de

librerías genéticas expresadas en fagos filamentosos, Kasahara *et al* determinaron la ubicación del epitopo reconocido por el anticuerpo monoclonal aCL EY1C8. Esta región fue localizada en la cara interna del dominio IV, normalmente escondida por el dominio III<sup>55</sup>, y que puede exponerse al modificar tres interacciones electrostáticas entre el dominio IV y el V<sup>56</sup>. Estas interacciones electrostáticas que mantienen unidos a los dos dominios son puentes de hidrógeno entre un aminoácido del cuarto dominio y un aminoácido localizado en el dominio V<sup>57</sup>. Los puentes de hidrógeno se localizan entre los aminoácidos: D<sup>193</sup>-K<sup>246</sup>, D<sup>222</sup>-K<sup>317</sup> y E<sup>228</sup>-K<sup>308</sup>. Recientemente, se reportó la presencia de epitopos en los dominios I-II, III y IV reconocidos por tres diferentes anticuerpos monoclonales a $\beta_2$ GPI<sup>58</sup>.

### **5.7. Papel fisiológico y patogénico de la $\beta_2$ -Glicoproteína I**

La participación de la  $\beta_2$ GPI en la respuesta autoinmune del SaF, las manifestaciones propias del padecimiento y los resultados obtenidos con esta proteína en diversas investigaciones han ligado fuertemente su participación con eventos trombóticos. La  $\beta_2$ GPI inhibe la activación por contacto de la vía intrínseca de la coagulación<sup>59</sup> y la agregación plaquetaria<sup>60</sup>. Con estos hallazgos se han propuesto mecanismos de generación de trombosis en los que participa la  $\beta_2$ GPI. De acuerdo con éstos, los eventos trombóticos del SaF pueden ser el resultado de una inhibición de la función de la  $\beta_2$ GPI y/o una disminución de su concentración plasmática<sup>61</sup>. Pueden deberse también, a la interferencia en las reacciones hemostáticas ocasionada por la respuesta inmune en contra de la  $\beta_2$ GPI<sup>61</sup>. Otras posibilidades propuestas son el depósito de complejos inmunes en la pared de los vasos, y la activación de eventos

mediados por células, como el incremento de la adhesión de monocitos al endotelio<sup>58,62</sup>. Recientemente, se ha propuesto también una teoría que relaciona al SaF con la aterosclerosis<sup>63</sup>, padecimiento crónico degenerativo multifactorial, que puede originarse como resultado de un proceso inmunológico. La asociación entre el SaF y la aterosclerosis esta basada en los resultados que muestran que existen eventos comunes en ambos padecimientos<sup>64</sup> (ver Tabla 1). El mecanismo propuesto, se apoya en las siguientes observaciones<sup>65</sup>: 1) Los anticuerpos a $\beta_2$ GPI de pacientes con SaF inducen la adhesión de monocitos a las células del endotelio vascular. 2) *In vitro*, la unión de  $\beta_2$ GPI a LDL oxidada (LDLox) inhibe la captura de ésta por los macrófagos (MØ). 3) Al inmunizar ratones transgénicos con  $\beta_2$ GPI la captura de la LDLox se incrementa.

De acuerdo con lo anterior, la peroxidación de los lípidos asociados a la LDL puede estar jugando un papel importante en el desarrollo de la placa ateromatosa. Fisiológicamente, la LDLox es capturada por el receptor "barrendero" de los MØ, si esta LDLox se une a la  $\beta_2$ GPI la captura se inhibe. Sin embargo, si existe la presencia de a $\beta_2$ GPI, entonces el complejo LDLox/ $\beta_2$ GPI/a $\beta_2$ GPI es capturado por los MØ a través de su receptor Fc, incrementando así la formación de células espumosas. De esta manera, la capacidad de la  $\beta_2$ GPI de unir estructuras aniónicas la relacionan otra vez con un proceso fisiológico de protección, pero nuevamente, estas propiedades de la  $\beta_2$ GPI sumadas a la presencia de a $\beta_2$ GPI se asocian a un proceso patológico relacionado a las manifestaciones clínicas del SaF.

Tabla 1 Asociación entre el SaF y la aterosclerosis (tomado de la Ref.64)

<b>SaF</b>	<b>Aterosclerosis</b>
aFL activan endotelio	Se inicia por expresión de moléculas de adhesión como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1
Titulos altos de anticuerpos anti-LDLox	Correlación con anti-LDLox
Estado protrombótico	Activación del sistema de coagulación como parte del avance de la lesión aterosclerótica
Inducción de SaF experimental por inmunización con $\beta_2$ GPI	Inducción de aterosclerosis temprana en ratones transgénicos inmunizados con $\beta_2$ GPI
Inducción de SaF experimental por inmunización con aFL	Aumento en el deposito de grasa en ratones transgénicos inmunizados con aFL

### 5.8. $\beta_2$ -Glicoproteína I: aspectos genéticos

La estructura polipeptídica de la  $\beta_2$ GPI esta determinada genéticamente, su gen fue mapeado en el cromosoma 17q23-qter<sup>66</sup> y se sabe que existen variantes entre individuos. En esta proteína se han identificado tanto variaciones cuantitativas como cualitativas. La variación cuantitativa es el resultado de la presencia de un alelo nulo (**Bg\*D**) que es codominante con respecto al alelo normal (**Bg\*N**)<sup>67</sup>. La frecuencia del alelo nulo es baja en la población caucásica (~0.06, Tabla 2) y alta en la población negra de Mozambique (0.26, Tabla 2) y en las poblaciones asiáticas de Irán, Afganistán, y Corea (0.11, 0.12 y 0.22 respectivamente)<sup>68</sup>.



Tabla 2. Distribución de frecuencias de los alelos *Bg\*N* y *Bg\*D* de la  $\beta_2$ GPI en diferentes poblaciones. Modificada de la Ref.68.

Población/ Lugar	n	<i>Bg*N</i>	<i>Bg*D</i>
<b>EUROPA</b>			
Alemania	210	0.953	0.047
Grecia	157	0.924	0.076
Hungría	151	0.940	0.060
Islandia	97	0.940	0.060
Irlanda	107	0.948	0.052
Reino Unido	381	0.941	0.059
<b>ASIA</b>			
Irán	141	0.886	0.114
Afganistán	210	0.876	0.124
Pakistán	79	0.949	0.051
India (Región Norte)	108	0.954	0.046
India (Región Este)	964	0.954	0.046
Filipina	88	0.937	0.063
Corea	105	0.780	0.220
<b>AFRICA</b>			
Mozambique	151	0.742	0.258
Sureste de África	250	0.950	0.050
<b>SUDAMÉRICA</b>			
Ecuador	90	0.967	0.033

*Bg\*N*: alelo Normal

*Bg\*D*: alelo Deficiente

Los individuos homocigotos para el alelo *Bg\*N* presentan niveles normales de  $\beta_2$ GPI (160-300  $\mu$ g/mL), mientras que los heterocigotos tienen una disminución en estos niveles (60-140  $\mu$ g/mL). Los niveles de  $\beta_2$ GPI en los individuos homocigotos para el alelo deficiente están por debajo de los límites de detección<sup>69</sup>. A pesar de lo anterior, es importante enfatizar que no sólo los factores genéticos contribuyen en la variación de los niveles séricos de la  $\beta_2$ GPI<sup>67</sup>.

Además de la variación cuantitativa, también existe heterogeneidad en la estructura de la  $\beta_2$ GPI. El estudio genético de las apolipoproteínas, condujo a Kamboh *et al* a determinar diferencias estructurales de la  $\beta_2$ GPI en la población estadounidense

de raza negra y blanca mediante isoelectroenfoque (IEE) seguido de inmunoprecipitación (IP) con un antisuero policlonal para identificar a la  $\beta_2$ GPI<sup>69</sup>. La investigación de Kamboh, mostró que la variación estructural era de dos tipos: a) intraindividuo, también conocida como microheterogeneidad y que es el resultado del diferente grado de glicosilación de la proteína y b) interindividuo, ocasionada por sustituciones de aminoácidos y por tanto determinada genéticamente. De esta última variación, fue posible detectar cuatro variantes alélicas designadas como APOH\*1, APOH\*2, APOH\*3, y APOH\*4, resaltando que el alelo APOH\*4 se encontró exclusivamente en la raza negra<sup>69</sup>. Publicaciones posteriores de este grupo de investigadores han confirmado este singular hallazgo en la población nigeriana y en la población negra de Norteamérica<sup>70-73</sup>. Los datos obtenidos en el estudio de familias establecieron que el patrón de herencia seguido por los alelos es autosómico codominante. El polimorfismo estructural ha sido estudiado en otras poblaciones, en donde se encontró una frecuencia predominante del alelo APOH\*2, considerado entonces como alelo silvestre. Debe resaltarse también, la semejanza que existe entre las diversas poblaciones que pertenecen a la misma raza, en las que las distribuciones de frecuencias fueron similares. En el caso de la raza negra la homogeneidad entre poblaciones evidenció una disminución en la frecuencia del alelo APOH\*1. En contraste con lo anterior, en los aborígenes Australianos se observó un incremento importante en la frecuencia del alelo APOH\*1(0.13,Tabla 3) y una ausencia del alelo APOH\*3<sup>74</sup>. Además, en la población de Siberia se encontraron las frecuencias mas bajas de APOH\*2 y las mas altas de APOH\*3<sup>75</sup>. La Tabla 3 muestra las frecuencias encontradas hasta 1999.

Tabla 3. Distribución de frecuencias de los alelos APOH\*1, 2, 3 y 4 de la  $\beta_2$ GPI en diferentes poblaciones

Población	Alelos					Fuente
	N	APOH*1	APOH*2	APOH*3	APOH*4	
<b>Blanca</b>						
-Alemana	238	0.050	0.891	0.059	0	Richter & Cleve (1988) <sup>76</sup>
-Tiroleses	196	0.059	0.882	0.067	0	Richter & Cleve (1988)
-Estadounidense	153	0.059	0.882	0.059	0	Kamboh <i>et al</i> (1988)
-Estadounidense	445	0.027	0.897	0.076	0	Eichner <i>et al</i> (1989)
-Estadounidense	661	0.059	0.868	0.073	0	Sanghera <i>et al</i> (1997)
<b>Negra</b>						
Nigeriana	356	0.011	0.897	0.071	0.021	Sepehrnia <i>et al</i> (1989)
Nigeriana	771	0.008	0.879	0.10	0.013	Kamboh <i>et al</i> (1999)
-Estadounidense	148	0.017	0.902	0.068	0.013	Kamboh <i>et al</i> (1988)
-Estadounidense	45	0.022	0.822	0.156	0	Eichner <i>et al</i> (1989)
-Estadounidense	422	0.011	0.921	0.008	0.01	Sanghera <i>et al</i> (1997)
<b>Asiática</b>						
-China	872	0.031	0.900	0.069	0	Saha <i>et al</i> (1992) <sup>77</sup>
-Indú	179	0.061	0.866	0.073	0	Saha <i>et al</i> (1992)
-Filipina	91	0.055	0.923	0.022	0	Saha <i>et al</i> (1992)
-Malaya	17	0.088	0.882	0.029	0	Saha <i>et al</i> (1992)
Aborígenes australianos	66	0.130	0.870	0	0	Kamboh <i>et al</i> (1991)
Siberianos	113	0.013	0.788	0.199	0	Kamboh <i>et al</i> (1996)
Hispanos	444	0.043	0.915	0.027	0.016	Sanghera <i>et al</i> (1997)

En 1995, Kamboh *et al.* informaron que el alelo APOH\*3 tiene dos variantes: APOH\*3<sup>W</sup> y APOH\*3<sup>B</sup>. Lo anterior tiene como sustento el hecho de que la proteína producto del alelo puede o no ser reconocida por el anticuerpo monoclonal 3D11 a  $\beta_2$ GPI. El 3D11 sólo reconoce el producto del alelo APOH\*3 y muestra reactividad preferentemente por la proteína de la raza blanca, por lo que al alelo que codifica para la  $\beta_2$ GPI reconocida por el anticuerpo 3D11 se le denominó APOH\*3<sup>W</sup>, mientras que al alelo del producto no reconocido se le llamó APOH\*3<sup>B</sup> por presentarse predominantemente en individuos de raza negra<sup>78</sup>. La Tabla 4 muestra las frecuencias de los alelos APOH\*3<sup>W</sup> y APOH\*3<sup>B</sup> encontradas. Un hallazgo importante observado en el estudio fue que la  $\beta_2$ GPI de algunos individuos homocigotos para el alelo APOH\*3 no

presentaba unión con fosfolípidos aniónicos (CL o fosfatidilserina) y por lo tanto no podía actuar como cofactor de los aCL patogénicos. El estudio sugirió que el fenómeno era consecuencia de la presencia homocigota del alelo APOH\*3<sup>W</sup>.

Tabla 4. Detección de los alelos APOH\*3<sup>W</sup> y APOH\*3<sup>B</sup> por el anticuerpo monoclonal 3D11 en individuos previamente identificados como portadores del alelo APOH\*3 mediante el uso de un antisero policlonal a $\beta_2$ GPI (fenotipos de APOH: 3-3, 3-2, 1-3, o 3-4)

Población	n	Con APOH*3 <sup>W</sup> (%)	Con APOH*3 <sup>B</sup> (%)
Estadounidense blanca <sup>#</sup>	66	59 (89)	7 (11)
Estadounidense blanca no hispana <sup>2</sup>	85	69 (81)	16 (19)
Estadounidense negra <sup>#</sup>	54	7 (13)	47 (87)
Estadounidense negra <sup>&amp;</sup>	46	7 (15)	39 (85)
China <sup>#</sup>	25	25 (100)	0 (0)
Africana negra <sup>#</sup>	10	0 (0)	10 (100)
Polinesia <sup>#</sup>	4	3 (75)	1 (25)
Hispana <sup>&amp;</sup>	33	23 (70)	10 (30)

#: Kamboh *et al.* 1995

&: Sanghera *et al.* 1997

### 5.9. Bases moleculares de los polimorfismos estructurales

La variación cualitativa interindividuo de la  $\beta_2$ GPI, que responde a la existencia de diferentes alelos presentes en un individuo, es el resultado de variaciones a nivel del ADN. Estas diferencias genéticas, conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's), son modificaciones en el ADN que consisten en el intercambio de una base nitrogenada por otra, *mutaciones puntuales*. Debido a que el código genético es degenerado, este tipo de mutaciones frecuentemente no se manifiestan en el fenotipo, es decir son silenciosas, sin embargo, en el caso de la  $\beta_2$ GPI se han reportado 4 mutaciones puntuales que alteran la información del codón correspondiente, resultando en el reemplazo de un aminoácido por otro. Los SNP's reportados hasta la fecha se encuentran en las posiciones 88, 247, 306 y 316 del gen de la  $\beta_2$ GPI<sup>73,79,80</sup> (Tabla 5).

Tabla 5. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) de la  $\beta_2$ GPI. La tabla muestra la posición correspondiente de cada SNP en el gen y su ubicación en el respectivo dominio de la proteína, así como el cambio de información que ocurre producto de la mutación.

SNP	Localización	Dominio	Reemplazo de base nitrogenada	Reemplazo de aminoácido	Enzima*
1 <sup>s</sup>	88 (exón 3)	2°	G→A	Ser→Asn	<i>Tsp 509 I</i>
2 <sup>ns</sup>	247 (exón 7)	5°	C→G	Val→Leu	<i>Rsa I</i>
3 <sup>s</sup>	306 (exón 8)	5°	T→C	Cys→Gly	<i>CviJ I</i>
4 <sup>s</sup>	316 (exón 8)	5°	G→C	Trp→Ser	<i>BstB I</i>

\*Endonucleasa utilizada en la tipificación genética

$\pi$ : Sanghera *et al.* (1997)

N:Steinkasserer *et al.* (1993)

Existe fuerte evidencia de que la mutación en la posición 88 es específica para el alelo APOH\*1<sup>73</sup>. Esta mutación que sustituye el aminoácido serina por asparagina estuvo presente en todos los portadores del alelo APOH\*1 del estudio realizado por Sanghera *et al* y por lo tanto distingue al alelo APOH\*1 del alelo silvestre APOH\*2. En este mismo estudio se encontró que la mutación en la posición 316 (Triptófano/serina) establece la diferencia entre el alelo APOH\*3<sup>W</sup> y el APOH\*2. Es oportuno señalar que a pesar de los resultados de esta investigación, no se descarta que los alelos APOH\*1 y APOH\*3<sup>W</sup> puedan tener otras mutaciones<sup>73</sup>.

#### 5.10. Polimorfismo genético de la $\beta_2$ -Glicoproteína I y Síndrome anti-fosfolípido

El análisis de familias de pacientes con SaF ha evidenciado que el factor genético contribuye de alguna manera en la presentación de la enfermedad. Un estudio retrospectivo mostró que el 41% de los pacientes con SaFP, tenían uno o más familiares con evidencia de al menos una característica clínica de SaF, como trombosis o pérdida fetal recurrente. Para el caso de los pacientes con SaFS el resultado fue 35%<sup>81</sup>. Los familiares afectados fueron de sexo femenino principalmente (madre, abuela hermana), lo que concuerda con la tendencia de género que se presenta en el SaF.

En 1998, Kamboh y Mehdi observaron que variaciones en el gen de la  $\beta_2$ GPI podían afectar su unión a FL aniónicos (CL o fosfatidilserina). Las mutaciones responsables del fenómeno se localizaron en las posiciones 306 (Cys→Gly) y 316 (Trp→Ser), ambas en el quinto dominio. La  $\beta_2$ GPI de los individuos homocigotos para cada mutación o heterocigotos para ambas mostró incapacidad para unirse con FL aniónicos<sup>82</sup>. Los autores proponen que esto se debe a que la mutación Ser316 afecta la unión de tipo hidrofóbica entre la  $\beta_2$ GPI y las cadenas hidrocarbonadas del FL, ya que involucra la inserción de un aminoácido polar (serina) en la secuencia apolar 313-316 (Leu-Ala-Phe-Trp) que presumiblemente interviene en las interacciones no polares entre las dos moléculas. Por otro lado, la mutación en la posición 306 parece afectar la configuración normal del quinto dominio debido a que ocasiona la substitución del aminoácido cisteína, el cual forma un puente disulfuro con su homólogo de la posición 281, que pertenece al sitio de unión al FL (281-288). Ahora bien, debido a que la unión de la  $\beta_2$ GPI a FL aniónicos es un evento necesario para el reconocimiento de los aCL presentes en pacientes con SaF, la variación genética de la  $\beta_2$ GPI descrita, que impide la unión de los FL con la proteína, afectará negativamente la producción de los aCL. Este fenómeno fue examinado en 222 pacientes con LEG, comprobándose que la distribución del polimorfismo 316 Trp/Ser fue significativamente diferente en aquellos pacientes con aCL positivos de los pacientes aCL negativos, lo que sugiere una probable protección contra la producción de aCL por parte del alelo mutante en la posición 316. A diferencia de lo anterior, la presencia de a $\beta_2$ GPI no se asoció con ningún polimorfismo en estos pacientes<sup>83</sup>.

Por otro lado, el polimorfismo en la posición 247, que involucra a los aminoácidos valina y leucina (Figura 3), se encuentra entre el sitio de unión al FL y la región que expone el epitopo críptico. Este polimorfismo ha sido estudiado en pacientes con SaF de las poblaciones asiática<sup>84</sup>, caucásica<sup>79,84,85</sup> y negra americana<sup>84</sup>, destacando que a diferencia del polimorfismo estructural, el polimorfismo en la posición 247 tiene una distribución heterogénea entre las distintas poblaciones (Tabla 6).

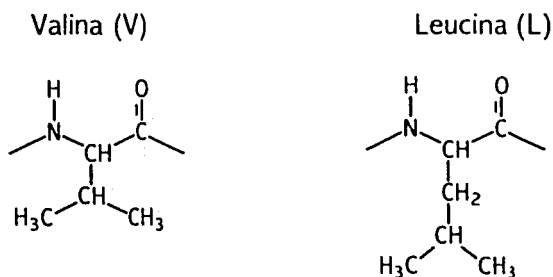


Figura 3. Aminoácidos involucrados en el polimorfismo de la posición 247 del gen de la  $\beta_2$  - Glicoproteína I.

En 1999, un estudio multicéntrico en donde se analizó a los pacientes con SaFP y SaFS como una población homogénea, reportó que la presencia del alelo valina y el genotipo val/val estaban asociados significativamente con la presencia de anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GPI en pacientes con SaF de origen asiático ( $p=0.0018$  y  $0.0003$ , respectivamente)<sup>84</sup>. En este mismo estudio, Hirose *et al* no encontraron asociación alguna en las poblaciones negra y caucásica. No obstante, Atsumi *et al* informaron la existencia de correlación entre el alelo valina y pacientes caucásicos con SaFP y presencia de anticuerpos aCL. En este último estudio se analizaron también los

polimorfismos en las posiciones 88 y 316, ambos carecieron de correlación con la enfermedad o la presencia de aCL<sup>85</sup>.

Tabla 6. Distribución alélica y genotípica del polimorfismo de la  $\beta_2$ GPI en la posición 247 en diferentes poblaciones.

Población	Genotipo			Alelos		Fuente
	VV	VL	LL	V	L	
-Caucásica	0.58	0.35	0.06	0.76	0.24	Steinkasserer <i>et al</i>
-Caucásica	0.43	0.49	0.08	0.68	0.32	Hirose <i>et al</i>
-Caucásica				0.71	0.29	Atsumi <i>et al</i>
-Africana americana	0.15	0.61	0.24	0.46	0.54	Hirose <i>et al</i>
-Asiática	0.04	0.40	0.56	0.24	0.76	Hirose <i>et al</i>



## **6. Materiales y Métodos**

Las muestras de suero y sangre total anticoagulada (con EDTA o heparina) se obtuvieron de pacientes con diagnósticos de SaF o SaF/cofactor en sus variantes primaria y asociada a LEG, que acuden a la consulta de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las muestras de los individuos utilizados como controles se obtuvieron del banco de sangre del mismo Instituto. Todos los individuos evaluados pertenecen a la población mestiza mexicana.

### **6.1. Sujetos de estudio**

*Individuos sanos* (106): Sujetos clínicamente sanos de ambos sexos entre 18 y 50 años de edad en cuyos sueros los exámenes de laboratorio para sífilis, hepatitis B y VIH resultaron negativos.

*Pacientes con síndrome anti-fosfolípido primario* (27). Individuos que reúnen los criterios de clasificación propuestos en 1989 por Alarcón-Segovia y Sánchez-Guerrero<sup>10</sup>. (ver apéndice II)

*Pacientes con síndrome anti-fosfolípido secundario asociado a lupus eritematoso generalizado* (40). Individuos que reúnen los criterios de clasificación propuestos por Alarcón-Segovia *et al*<sup>11</sup>. (ver apéndice II)

*Pacientes con síndrome anti-fosfolípido/cofactor primario* (12). Individuos que reúnen los criterios de clasificación propuestos por Cabral *et al*<sup>38</sup>. (ver apéndice II)

*Pacientes con síndrome anti-fosfolípido/cofactor secundario asociado a lupus eritematoso generalizado (7).* Individuos que reúnen los criterios de clasificación propuestos por Alarcón-Segovia *et al*<sup>39</sup>. (ver apéndice II)

## **6.2. Aislamiento del ADN genómico**

Diez mL de sangre con EDTA al 2% fueron tratados con 40 mL de amortiguador de lisis (Sacarosa 0.32 M, Triton X-100 al 1%, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5mM, Tris HCl 12 mM pH 7.5) y se agitó suavemente. Posteriormente se centrifugó a 1200 g durante 10 minutos a Temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se decantó y el botón resultante se resuspendió utilizando 20 mL de amortiguador de lisis. Nuevamente se centrifugó a 1200 g durante 10 minutos a TA. El botón fue resuspendido en 160 µL de amortiguador 5X de Proteinasa K (NaCl 0.375 M, EDTA 0.12 M pH 8.0), 40 µL de Proteinasa K, 40 µL de SDS 20% y 560 µL de agua destilada desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>), y se incubó 2 horas a 55°C. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de NaCl 6 M , se agitó vigorosamente 30 segundos y se centrifugó a 13000 g por 10 minutos. Se trasvasó el sobrenadante a un tubo de 1.7 mL y se centrifugó dos veces más a 13000 g 10 minutos. El ADN se precipitó con 900 µL de Etanol absoluto a TA.

### 6.3. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-anidada

La amplificación del fragmento de ADN que presenta el polimorfismo en la posición 247 se realizó mediante un ciclo de amplificación con los oligonucleótidos **1F** (5'GTGTAGGTGTACTCATCTACTGTGT3') y **1R** (5'CACCATGTAGCATTCCA TTC3') y una re-amplificación del producto con el oligonucleótido interno **2R** (5'CTCTCCTTGGTACAC CACAGTGGC3') y el complementario igual al que dio origen al primer producto de la amplificación<sup>83</sup>. El producto de la primera amplificación fue una secuencia de 193 pb, mientras que en la segunda amplificación se obtuvo un fragmento de 147 pb (ver Figura 4).

La PCR se realizó en un volumen de 100  $\mu$ l que consistió de 2  $\mu$ M de cada iniciador (1F y 1R), 200 nM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X (amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 9.0, KCl 500 mM, Tritón X-100 al 1%) y 5 mL de DMSO al 5%. El volumen final se obtuvo adicionando agua tratada con dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC). Después de la primera desnaturalización a 95 °C durante un minuto, se adicionaron 2.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Promega), dejando la reacción a esta temperatura por cuatro minutos más. Los parámetros de amplificación fueron 35 ciclos de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C por 2 minutos, acoplamiento de los iniciadores a 52°C por 1 minuto y extensión a 72°C por un minuto. El último paso fue una incubación de 10 minutos a 72°C para permitir que se completaran todas las amplificaciones que quedaron inconclusas. Para la PCR de la re-amplificación se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos pero con las siguientes modificaciones: los iniciadores empleados fueron el 1F y el 2R. La re-amplificación consistió de 20 ciclos con las siguientes características: desnaturalización

a 94°C por un minuto, acoplamiento de los iniciadores a 56°C por un minuto y extensión a 72°C por un minuto, con el último paso de incubación de 10 minutos a 72°C. Tanto la amplificación como la re-amplificación se realizaron en un termociclador (Stratagene).

#### **6.4. Identificación del polimorfismo en la posición 247 por digestión con la enzima de restricción *Rsa I***

Veinte  $\mu\text{L}$  del producto final de la reacción de re-amplificación fueron digeridos con 30 unidades de la enzima de restricción *Rsa I* (Gibco BRL) por 2 horas a 37°C. El volumen final de la reacción fue 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo además de lo anterior, 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 10X ( Tris-HCl 50 mM pH 8.0,  $\text{MgCl}_2$  10 mM) y  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y desionizada ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ ). Posteriormente, 15  $\mu\text{L}$  de fragmentos de ADN digerido y no digerido se corrieron en un gel de agarosa (Gibco BRL) al 1.25 % en amortiguador de TBE (890 mM de Trisma, ácido bórico 890 mM y EDTA 20 mM pH 8.0) que contenía bromuro de etidio al 0.05%. El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.



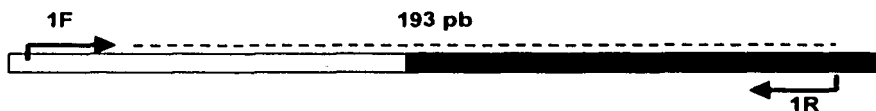
## 1) PCR semi-anidada

Iniciadores:

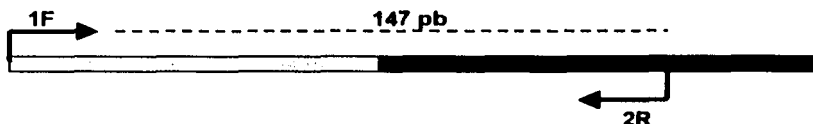
Nombre	Secuencia	Ubicación
1F	5'GTGTAGGTTACTCATCTACTGTGT3'	(dentro del intrón 6)
1R	5'CACCATGTAGCATTCCA TTC3'	882-901
2R	5'CTCTCCTTGGTACAC CACAGTGGC3'	832-855

Los sitios de restricción de la *Rsa* I localizados en los iniciadores 1F y 2R aparecen subrayados

- Amplificación



- Re-amplificación



## 2) Digestión con la enzima de restricción *Rsa* I

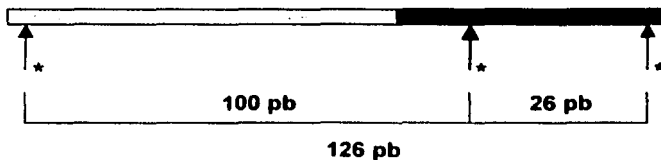


Figura 4. Representación esquemática de la estrategia utilizada en la determinación genotípica. La posición 817 del fragmento de ADN estudiado aparece en rojo marcando la posición genómica donde se presenta el polimorfismo y el posible sitio de restricción. 1) Reacción de PCR. 2) Digestión enzimática; se muestran con flechas los lugares de reconocimiento de la enzima *Rsa* I. La presencia de Guanina (valina) en dicha posición origina productos de 100 pb porque la secuencia es reconocida por la *Rsa* I, mientras que con la presencia de Citosina (leucina), al no haber reconocimiento, se obtienen fragmentos de 126 pb.

\*Secuencia de reconocimiento de la *Rsa* I: **GTAC**

### **6.5. ELISA para la detección de anticuerpos aCL y a $\beta_2$ GPI.**

La detección de la actividad anti-CL isotipos IgG e IgM y anti- $\beta_2$ GP-I isotipos IgG e IgM se hizo mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) con equipos comerciales (The Binding Site, Birmingham, UK) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

### **6.6. ELISA para la detección de anticuerpos anti- cardiolipina "verdaderos".**

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Inc, Danemark 97F 4-39454) con 50  $\mu$ L de CL (SIGMA Chemicals Co, St Louis MO.) a una concentración de 50 mg/ml, disueltos en alcohol etílico (J. T. Baker). El etanol se evaporó con nitrógeno gas durante 30 minutos aproximadamente, cambiando de posición la placa para que el nitrógeno impactara directamente sobre los pozos. Una vez que se evaporó el etanol, se bloquearon los sitios inespecíficos con 350  $\mu$ L de una solución al 1.5 % de albúmina sérica bovina (SIGMA) en PBS (NaCl 0.15M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01M pH 7.4) por dos horas a TA. Posteriormente, se lavaron las placas tres veces por tres minutos cada lavado, se secaron invirtiéndolas y golpeándolas contra una superficie absorbente y se guardaron toda la noche a 4 °C. Las diluciones de los sueros (1:100) se hicieron en ASB al 1.5 % y se congelaron toda la noche. A la mañana siguiente las diluciones de las muestras se descongelaron a TA y las placas se pusieron a TA 15 minutos antes de empezar el ensayo. Se aplicaron 200  $\mu$ L de cada muestra por duplicado en los pozos de las placas sensibilizadas. La aplicación de las muestras se hizo en el menor tiempo posible ya que la incubación empieza al aplicar la primera muestra. Las placas con las muestras se incubaron por una hora a TA y posteriormente se lavaron tres veces como se mencionó anteriormente. El anticuerpo anti-humano conjugado con la enzima fosfatasa

alcalina específico contra IgG o IgM (anticuerpo anti-cadenas  $\gamma$  o  $\mu$  humanas de SIGMA) se diluyó 1:10 000 en ASB 1.5%. Las placas con el conjugado se incubaron por una hora a TA, en la oscuridad. Transcurrida la incubación se hicieron tres lavados como se mencionó y se agregaron 200  $\mu$ l por pozo del sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato, SIGMA) a una de concentración de 1mg/ml disuelto en solución amortiguadora de dietanolamina (J. T. Baker) al 10% y 0.0005 M de  $MgCl_2$  (J.T. baker) pH 9.8. Las placas con el sustrato se incubaron a 37°C una hora en la oscuridad y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microELISA (Labsystems Multiskan MS type 352, Labssystem, Dynmark).

#### **6.7. Análisis estadístico**

La comparación de los resultados de las frecuencias alélicas y genotípicas entre los diferentes grupos estudiados se realizó con el estadístico de prueba Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) (ver apéndice I). Para los casos donde las frecuencias esperadas obtenidas con el cálculo del estadístico  $\chi^2$  que tenían un valor inferior a 5 excedían el 20%, se utilizó como estadístico la prueba exacta de Fisher empleando el programa informático SPSS versión 10.0 (ver apéndice I). En las dos pruebas mencionadas los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, y en estos casos se calculó el Riesgo relativo aproximado (RRa) (ver apéndice I).



## 7. Resultados

### 7.1. Análisis descriptivo de las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo<sup>247</sup> del gen de la $\beta_2$ GPI

Se determinó el genotipo correspondiente a la posición 247 del gen de la  $\beta_2$ GPI en los 106 sujetos sanos y en los 86 pacientes con SaF en cualquiera de sus variantes. De estos 86 pacientes con SaF, 27 estaban clasificados como SaFP, 12 como SaF/C Primario (SaF/CP), 40 como SaFS y 7 como SaF/C Secundario (SaF/CS). La figura 5 muestra el patrón electroforético obtenido con cada genotipo en un gel de agarosa.

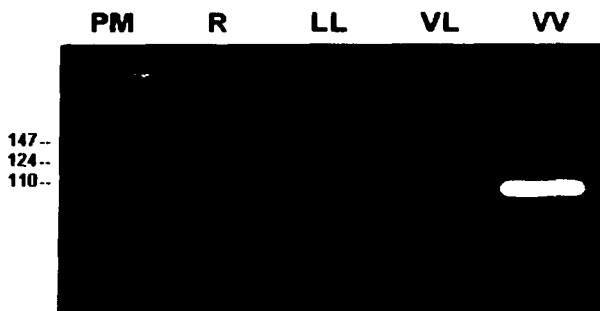


Figura 5. Fotografía del gel de agarosa 1.25%, en donde se muestra el patrón electroforético de los tres posibles genotipos del polimorfismo de la posición 247 del gen de la  $\beta_2$ GPI (LL, VL y VV). R: producto de la re-amplificación sin digerir. PM: marcador de pesos moleculares (pb).

De acuerdo con la estrategia empleada, los fragmentos de ADN de individuos homocigotos que presentaban el codón correspondiente al aminoácido Leucina (LL) migraron en el gel formando una sola banda de aproximadamente 126 pb. Los fragmentos de ADN de individuos homocigotos para el alelo que codifica para el

aminoácido Valina (VV) en el codón correspondiente, migraron formando una única banda de 100 pb, mientras que los fragmentos de ADN de individuos heterocigotos (VL) migraron formando dos bandas en el gel, una de 126 y otra de 100 pb. Los fragmentos de ADN sin digerir producto de la PCR semi-anidada migraron formando una banda de 147 pb.

Una vez determinados los genotipos, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas. En el caso de la frecuencia alélica se consideró que cada individuo tiene dos alelos por *locus*.

### 7.1.1. Sujetos sanos

Las frecuencias genotípicas y alélicas de la población de sujetos sanos se analizaron por genero, los resultados se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas en mujeres sanas (n=77)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	10	0.13
VL	39	0.51
LL	28	0.36
<b>Alelo</b>		
V	59	0.38
L	95	0.62

La edad promedio de los sujetos fue  $31 \pm 8$  años.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas en hombres sanos (n=29)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	4	0.14
VL	16	0.55
LL	9	0.31
<b>Alelo</b>		
V	24	0.41
L	34	0.59

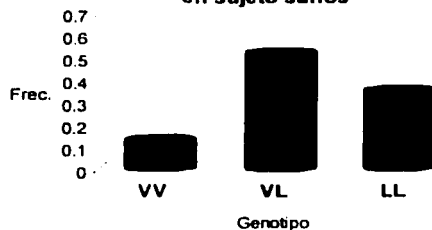
La edad promedio de los sujetos fue  $28 \pm 7$  años.

Debido a que no se encontró diferencia significativa ( $\alpha=0.876$  y  $0.683$  en genotipo y alelo, respectivamente) entre el grupo de individuos sanos de sexo femenino y su homólogo de sexo masculino, la población sana se considero como una sola. Los resultados se presentan a continuación:

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas en sujetos sanos (n=106)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	14	0.13
VL	55	0.52
LL	37	0.35
<b>Alelo</b>		
V	83	0.39
L	129	0.61

Figura 6  
Distribución de frecuencias del genotipo en sujeto sanos



Con las frecuencias alélicas se calcularon las frecuencias teóricas esperadas de acuerdo con el Equilibrio Hardy-Weinberg<sup>86</sup>. Los resultados de este cálculo para los genotipos VV, VL y LL fueron 0.15, 0.48 y 0.37, respectivamente.

La distribución de frecuencias del genotipo muestra que el estado homocigoto más frecuente en la población mestiza mexicana sana estudiada fue LL (0.35). Consecuentemente con lo anterior el alelo L se presenta con mayor frecuencia en dicha población (0.61). Con base en estos hallazgos se dedujo que el alelo silvestre para la posición 247 del gen de la  $\beta_2$ GPI en dicha población codifica para Leucina.

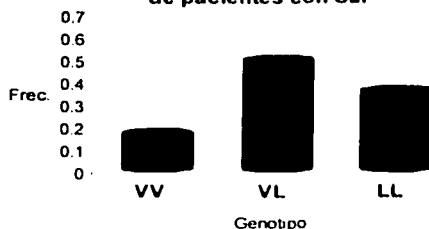
### 7.1.2. Pacientes con SaF

La distribución de frecuencias del genotipo de la población total de pacientes estudiados fue la siguiente:

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con SaF (n=86)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	14	0.16
VL	42	0.49
LL	30	0.35
<b>Alelo</b>		
V	70	0.41
L	102	0.59

Figura 7  
Distribución de frecuencias del genotipo de pacientes con SaF



La gráfica presenta un patrón de distribución similar al obtenido con los resultados de los sujetos sanos, es decir, la mayor parte de los individuos son heterocigotos (0.49), una menor cantidad es homocigota para el alelo leucina (0.35), y por último los individuos homocigotos para el alelo valina son los que se presentan con menor frecuencia (0.16).

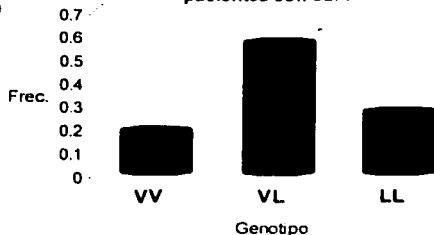
### 7.1.3. Pacientes con SaFP

Las distribuciones de frecuencias genotípica y alélica de estos, se muestran en la Tabla 11 y Figura 8.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con SaFP (n=27)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	5	0.18
VL	15	0.56
LL	7	0.26
<b>Alelo</b>		
V	25	0.46
L	29	0.54

Figura 8  
Distribución de frecuencias del genotipo de pacientes con SaFP



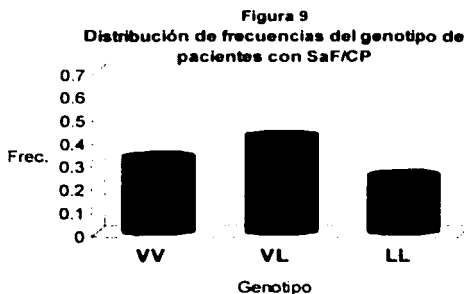
Nuevamente, el análisis descriptivo de los resultados muestra que el patrón de distribución que se observa en la gráfica, es similar al obtenido con los resultados de los sujetos sanos, aunque debe advertirse un ligero incremento en la frecuencia del genotipo VV y una disminución en la frecuencia del genotipo LL.

#### 7.1.4. Pacientes con SaF/C Primario (SaF/CP)

Los resultados obtenidos con los pacientes con SaF/CP se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con SaF/CP (n=12)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	4	0.33
VL	5	0.42
LL	3	0.25
<b>Alelo</b>		
V	13	0.54
L	11	0.46



Como puede observarse, el patrón de distribución de los genotipos en los pacientes con SaF/CP es diferente al de los sujetos sanos, aunque en estos pacientes el genotipo heterocigoto sigue siendo el más frecuente, el número de individuos con genotipo VV (0.33) es superior al de los que tienen el genotipo LL (0.25).

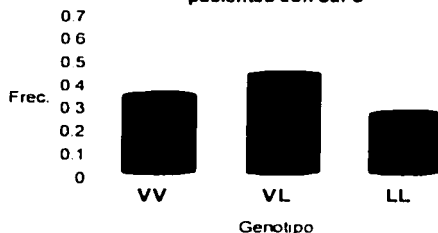
#### 7.1.5. Pacientes con SaFS

En el caso de los pacientes con SaFS la distribución de los genotipos se muestra en la Tabla 13 y Figura 10.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con SaFS (n=40)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	5	0.13
VL	17	0.43
LL	18	0.45
<b>Alelo</b>		
V	27	0.34
L	53	0.66

Figura 10  
Distribución de frecuencias del genotipo de pacientes con SaFS



El análisis descriptivo muestra que el patrón de distribución de las frecuencias genotípicas en pacientes con SaFS es diferente al de los sujetos sanos y al de pacientes con SaF/CP. En el SaFS los individuos con el genotipo LL son los más frecuentes (0.45).

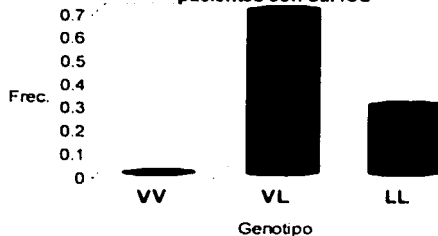
#### 7.1.6. Pacientes con SaF/C Secundario (SaF/CS)

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes con SaF/CS se muestran en la Tabla 14. El patrón de distribución de frecuencias genotípicas se muestra en la Figura 11.

Tabla 14. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con SaF/CS (n=7)

Genotipo	Casos	Frecuencia
VV	0	0.00
VL	5	0.71
LL	2	0.29
<b>Alelo</b>		
V	5	0.36
L	9	0.64

Figura 11  
Distribución de frecuencias del genotipo de pacientes con SaF/CS



En comparación con los sujetos sanos, el patrón de distribución de frecuencias de los genotipos en pacientes con SaF/CS no muestra diferencia, sin embargo debe advertirse que el número de estos pacientes es muy reducido.

## **7.2. Análisis del polimorfismo del gen de la $\beta_2$ GPI en la posición 247 en los pacientes con SaF.**

La tabla 15 muestra el análisis de los resultados obtenidos en cada variante del SaF. De acuerdo con el análisis estadístico no existe diferencia en la distribución genotípica entre los grupos estudiados ( $\alpha=0.420$  y  $0.358$  para genotipo y alelo, respectivamente), es decir, el genotipo y la población son variables independientes. Sin embargo, existe una sobreestimación de la prueba  $\chi^2$  debido a que el 40% de las frecuencias esperadas presentaron un valor inferior a 5. Debido a lo anterior, se realizó la comparación de los resultados obtenidos en cada variante *versus* los sujetos sanos. Dichas comparaciones confirmaron que en ninguna variante del SaF las frecuencias observadas son significativamente diferentes a las observadas en los sujetos sanos. Sin embargo, mientras que el análisis de los resultados de pacientes con SaFP ( $\alpha=0.605$  y  $0.340$  para genotipo y alelo, respectivamente), SaFS ( $\alpha=0.518$  y  $0.396$  para genotipo y alelo, respectivamente) y SaF/CS ( $p=0.594$  y  $1.000$  para la comparación de VV *versus* VL+LL y LL *versus* VL+VV, respectivamente) mostraron un comportamiento similar, la variante SaF/CP presentó una tendencia de asociación con el genotipo VV ( $p=0.086$  y  $0.749$  para la comparación de VV *versus* VL+LL y LL *versus* VL+VV, respectivamente)

Tabla 15. Comparación de la distribución de frecuencias de cada grupo de pacientes con el grupo de sujetos sanos.

Genotipo	Frecuencia				
	Sanos (106)	SaFP (27)	SaF/CP (12)	SaFS (40)	SaF/CS (7)
VV	0.13	0.18	0.33	0.13	0.00
VL	0.52	0.56	0.42	0.43	0.71
LL	0.35	0.26	0.25	0.45	0.29
			$\alpha=0.420$		
<b>Alelo</b>					
V	0.39	0.46	0.54	0.34	0.36
L	0.61	0.54	0.46	0.66	0.64
			$\alpha=0.358$		

40.0% de las f.e. en la prueba  $\chi^2$  del genotipo tuvieron un valor menor a 5. Para la comparación alélica el porcentaje fue 0.0%.

### 7.3. Análisis del polimorfismo del gen de la $\beta_2$ GPI en la posición 247 y la producción de autoanticuerpos en el SaF.

Aunque se determinó el genotipo correspondiente en 86 pacientes con SaF, solamente fue posible evaluar la presencia de autoanticuerpos en 65 de los mismos ya que únicamente se consiguió las muestras séricas de estos últimos pacientes. No obstante, el número de pacientes evaluados serológicamente en los cuatro grupos de pacientes es representativo de la población correspondiente a cada grupo. A este respecto, el número de pacientes con SaFP a los que se determinó la presencia de anticuerpos fue 21, si consideramos que el total de pacientes con SaFP es 27, entonces se analizó al 78%. En el caso del SaFS, el porcentaje de pacientes evaluados fue 63% (25/40). En los grupos de pacientes con SaF/CP y SaF/C se evaluó al 100% de la población (12/12 y 7/7, respectivamente).



### 7.3.1. Anticuerpos anti-cardiolipina "verdaderos"

Definidos como anticuerpos anti-cardiolipina "verdaderos" aquellos anticuerpos que reconocen CL en ausencia de  $\beta_2$ GPI, los resultados de la detección de dichos anticuerpos se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Pacientes con SaF y verdaderos anticuerpos aCL

Enfermedad	n	IgG (%)	IgM(%)
SaFP	21	100%	100%
SaF/CP	12	83%	83%
SaFS	25	100%	100%
SaF/CS	7	86%	100%

Valores normales = IgG: 0.11 DO, IgM: 0.07 DO.

### 7.3.2. Anticuerpos anti-cardiolipina dependientes de $\beta_2$ GPI (aCL)

En cada variante del SaF los resultados de la detección de aCL por isotipo fueron agrupados en cinco categorías: 1) pacientes con aCL IgG(+), 2) pacientes aCL IgG(-), 3) pacientes con aCL IgM(+), 4) pacientes aCL IgM(-), y 5) pacientes con aCL IgG(+), IgM(+).

#### 7.3.2.1. SaFP

Como se muestra en la Tabla 17, no se encontraron diferencias significativas entre las diversas categorías del grupo de pacientes con SaFP. Sin embargo, la frecuencia de pacientes con aCL IgG(+) e IgM(+) y genotipo *VV* se observó ligeramente incrementada comparada con la frecuencia observada en sujetos sanos (0.30 *versus* 0.13,  $p=0.163$ ).

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas en sujetos sanos y en pacientes con SaFP con o sin aCL séricos

Genotipo	Frecuencia					
	Sanos (106)	Pacientes con SaFP (21)				IgG e IgM
		IgG		IgM		
		(+) (15)	(-) (6)	(+) (16)	(-) (5)	(10)
VV	0.13	0.27	0.17	0.25	0.20	0.30 <sup>c</sup>
VL	0.52	0.53	0.50	0.44	0.80	0.40
LL	0.35	0.20	0.33	0.31	0.00	0.30 <sup>d</sup>
		$\alpha=0.709$				
<b>Alelo</b>						
V	0.39	0.53	0.42	0.47	0.60	0.50
L	0.61	0.47	0.58	0.53	0.40	0.50
		$\alpha=0.441$				

En la prueba  $\chi^2$  las f.e.<5 fueron el 61% en el caso de genotipos y el 8.3% en alelos.

<sup>c</sup>  $p=0.163$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con aCL IgG e IgM versus sujetos sanos.

<sup>d</sup>  $p=1.000$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con aCL IgG e IgM versus sujetos sanos.

Los resultados de todas las demás comparaciones con la prueba exacta de Fisher tuvieron valores  $p > 0.236$

### 7.3.2.2. SaFS

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas en sujetos sanos y en pacientes con SaFS con o sin aCL séricos

Genotipo	Frecuencia					
	Sanos (106)	Pacientes con SaFS (25)				IgG e IgM
		IgG		IgM		
		(+) (18)	(-) (7)	(+) (14)	(-) (11)	(10)
VV	0.13	0.11	0.00	0.07	0.09	0.10
VL	0.52	0.44	0.57	0.50	0.45	0.50
LL	0.35	0.44	0.43	0.43	0.45	0.40 <sup>e</sup>
		$\alpha=0.992$				
<b>Alelo</b>						
V	0.39	0.33	0.29	0.32	0.32	0.35
L	0.61	0.66	0.71	0.68	0.68	0.65
		$\alpha=0.899$				

En la prueba  $\chi^2$  las f.e.<5 fueron el 50% en el caso de genotipos y 0.0% en alelos.

<sup>e</sup>  $p=0.741$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con aCL IgG e IgM versus sujetos sanos.

$p=1.000$  en las comparaciones de presencia versus ausencia de aCL IgG en pacientes con SaFS (VV versus VL+LL y LL versus VL+VV).

$p=1.000$  en las comparaciones de presencia versus ausencia de aCL IgM en pacientes con SaFS (VV versus VL+LL y LL versus VL+VV).

Como se puede ver en la Tabla 18, no se observó correlación de algún genotipo en particular y la presencia de aCL de isotipo IgG o IgM en los 25 pacientes con SaFS evaluados serológicamente.

### 7.3.2.3. SaF/C primario y SaF/C Secundario

No se detectaron aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI séricos.

### 7.3.3. Anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI (a $\beta_2$ GPI)

El análisis de correlación con la presencia de a $\beta_2$ GPI en cada variante del SaF se muestra en los siguientes apartados.

#### 7.3.3.1. SaFP

21 pacientes con SaFP fueron evaluados para detectar a $\beta_2$ GPI de isotipo IgG.

Tabla 19. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con SaFP y presencia de autoanticuerpos a $\beta_2$ GPI.

Genotipo	Frecuencias		
	Sanos	Pacientes con SaFP (21)	
		a $\beta_2$ GPI (+) (15)	a $\beta_2$ GPI (-) (6)
VV	0.13 <sup>h</sup>	0.33 <sup>f</sup>	0.00
VL	0.52 <sup>h</sup>	0.40	0.83
LL	0.35 <sup>h</sup>	0.27 <sup>g</sup>	0.17
		$\alpha=0.145$	
<b>Alelo</b>			
V	0.39 <sup>f</sup>	0.53	0.42
L	0.61 <sup>f</sup>	0.47	0.58
		$\alpha=0.335$	

En la prueba  $\chi^2$  las f.e. <5 fueron: 55.5% en genotipos y 16.6% en alelos.

<sup>f</sup>  $p=0.262$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con a $\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin a $\beta_2$ GPI.

<sup>g</sup>  $p=1.000$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con a $\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin a $\beta_2$ GPI.

<sup>h</sup>  $\alpha=0.134$  para la comparación del genotipo de pacientes con a $\beta_2$ GPI y sujetos sanos (f.e. <5=16.6%)

<sup>f</sup>  $\alpha=0.139$  para la comparación alélica de pacientes con a $\beta_2$ GPI y sujetos sanos (f.e. <5=0.0%)

No se encontraron diferencias significativas en la distribuciones de frecuencias genotípicas y alélicas de los sujetos sanos y de los pacientes con SaFP con  $a\beta_2$ GPI.

### 7.3.3.2. SaF/CP

El análisis de los 12 pacientes con SaF/CP se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con SaF/CP y presencia de autoanticuerpos  $a\beta_2$ GPI.

Genotipo	Frecuencias		
	Sanos	Pacientes con SaF/CP (12)	
		$a\beta_2$ GPI (+) (9)	$a\beta_2$ GPI (-) (3)
VV	0.13	<sup>l</sup> 0.44 <sup>m</sup>	0.00 <sup>p</sup>
VL	0.52	<sup>l</sup> 0.44	0.33
LL	0.35	<sup>l</sup> 0.11 <sup>n</sup>	0.67
		$\alpha=0.078$	
<b>Alelo</b>			
V	0.39	<sup>l</sup> 0.67 <sup>o</sup>	0.17 <sup>q</sup>
L	0.61	0.33	0.83
		$\alpha=0.035$	

En la prueba  $\chi^2$  las f.e. <5 fueron: 66.6% en genotipos y 33.3% en alelos.

<sup>l</sup>  $p=0.033$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

<sup>k</sup>  $p=0.268$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

<sup>i</sup>  $p=0.022$  para la comparación de V versus L en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

<sup>m</sup>  $p=0.491$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin  $a\beta_2$ GPI.

<sup>n</sup>  $p=0.127$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin  $a\beta_2$ GPI.

<sup>o</sup>  $p=0.061$  para la comparación de V versus L en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin  $a\beta_2$ GPI.

<sup>p</sup>  $p=1.000$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes sin  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

<sup>q</sup>  $p=0.410$  para la comparación de V versus L en pacientes sin  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

<sup>r</sup>  $p=0.739$  para la comparación de VL versus VV+LL de pacientes con  $a\beta_2$ GPI versus sujetos sanos

De acuerdo con los resultados obtenidos con la prueba  $\chi^2$ , no existe diferencia significativa en la distribución del genotipo entre las poblaciones de individuos sanos y de sujetos con o sin anticuerpos a $\beta_2$ GPI ( $\alpha=0.078$ ). La distribución alélica si mostró diferencia entre las poblaciones arriba mencionadas ( $\alpha=0.035$ ). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los dos resultados de la prueba  $\chi^2$  están sobreestimados debido a que el porcentaje de frecuencias esperadas calculadas para la obtención del estadístico de prueba superan el 20%, por lo que se analizaron los datos con la prueba exacta de Fisher. Esta prueba mostró que existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con sujetos sanos *versus* pacientes con SaF/CP que tienen a $\beta_2$ GPI IgG(+). Esta diferencia estuvo asociada a la presencia del genotipo VV y al alelo V, es decir, el grupo de pacientes con SaF/CP con a $\beta_2$ GPI expresa el alelo V con mayor frecuencia que el grupo de sujetos control (0.67 *versus* 0.39;  $p=0.022$ ) y tiene una frecuencia significativamente mayor del genotipo homocigoto para dicho alelo (0.44 *versus* 0.13;  $p=0.033$ ). Los pacientes con SaF/CP sin anticuerpos a $\beta_2$ GPI no presentaron diferencia significativa en la distribución de frecuencias alélica y genotípica cuando se compararon con los controles sanos ( $p=1.000$  y  $p=0.410$ , respectivamente). Tampoco se encontró diferencia significativa en la frecuencia del genotipo VL cuando se comparó el grupo de los sujetos sanos con el grupo de pacientes con SaF/CP y a $\beta_2$ GPI ( $p=0.739$ ).

Es importante mencionar que los tres pacientes con SaF/CP que fueron a $\beta_2$ GPI IgG(-) tuvieron a $\beta_2$ GPI IgM(+).

### 7.3.3.3. SaFS

El análisis de los 25 pacientes con SaFS se muestra en la Tabla 21. No se observó diferencia significativa en la distribución de frecuencias del genotipo o alelo entre sujetos sanos y pacientes con o sin presencia de  $\alpha\beta_2$ GPI de isotipo IgG.

Tabla 21. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con SaFS en relación con autoanticuerpos  $\alpha\beta_2$ GPI.

Genotipo	Frecuencias		
	Sanos	Pacientes con SaFS	
		$\alpha\beta_2$ GPI (+) (10)	$\alpha\beta_2$ GPI (-) (15)
VV	0.13	0.10 <sup>a</sup>	0.07
VL	0.52	0.50	0.47
LL	0.35	0.40 <sup>b</sup>	0.47
		$\alpha=0.893$	
<b>Alelo</b>			
V	0.39	0.35	0.30
L	0.61	0.65	0.70
		$\alpha=0.604$	

En la prueba  $\chi^2$  las f.e.<5 fueron: 33.3% en genotipos y 0.0% en alelos.

<sup>a</sup>  $p=1.000$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con  $\alpha\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin  $\alpha\beta_2$ GPI.

<sup>b</sup>  $p=1.000$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con  $\alpha\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin  $\alpha\beta_2$ GPI.

### 7.3.3.4. SaF/CS

No se observó diferencia significativa en la distribución de las frecuencias alélicas entre los pacientes con SaF/CS con  $\alpha\beta_2$ GPI positivos y los pacientes sin dichos anticuerpos. Tampoco se encontró diferencia al comparar las frecuencias de los alelos de pacientes con SaF/CS con  $\alpha\beta_2$ GPI y los sujetos sanos.

Tabla 22. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con SaF/CS en relación con autoanticuerpos a $\beta_2$ GPI.

Genotipo	Frecuencias		
	Sanos	Pacientes con SaF/CS (7)	
		a $\beta_2$ GPI (+) (4)	a $\beta_2$ GPI (-) (3)
VV	0.13	0.00	0.00
VL	0.52	0.75	0.67
LL	0.35	0.25	0.33
		$\alpha=0.821$	
<b>Alelo</b>			
V	0.39	<sup>u</sup> 0.38 <sup>u</sup>	0.33
L	0.61	0.62	0.66
		$\alpha=0.956$	

66.6% de las f.e. en la prueba  $\chi^2$  del genotipo y alelo tuvieron un valor menor a 5. En la comparación genotípica de las dos categorías del grupo de pacientes con SaF/CS mediante la prueba exacta de Fisher no fue posible calcular el valor de  $p$  debido a que los casos de al menos una variable de la tabla 2X2 fueron constantes.

<sup>u</sup>  $p=1.000$  para la comparación de V versus L en pacientes con a $\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin a $\beta_2$ GPI.

<sup>v</sup>  $p=1.000$  para la comparación de V versus L en pacientes con a $\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

### 7.3.3.5. Variantes primarias

Debido a la correlación encontrada con el alelo V y su estado homocigoto (VV) y la producción de anticuerpos a $\beta_2$ GPI en pacientes con SaF/CP (Tabla 20), y el valor cercano a la significatividad en lo referente a dicho análisis en los pacientes con SaFP ( $\alpha=0.134$ , Tabla 19), se investigó si la correlación mencionada se mantenía al analizar juntos a los pacientes con SaFP y SaF/CP con anticuerpos a $\beta_2$ GPI, es decir, todos los pacientes con SaF que presentan el padecimiento como una entidad primaria y cuyos sueros tienen títulos altos de a $\beta_2$ GPI. El análisis de los resultados reveló que las distribuciones de frecuencias de los sujetos sanos y los pacientes con y sin a $\beta_2$ GPI son

significativamente diferentes ( $\alpha=0.031$  y  $\alpha=0.038$  para genotipo y alelo, respectivamente). El resultado de la prueba exacta de Fisher para variables agrupadas confirmó la asociación del genotipo homocigoto para valina con la producción de  $a\beta_2$ GPI, ( $p=0.014$  y  $0.039$  en la comparación con sujetos sanos y pacientes sin  $a\beta_2$ GPI, respectivamente), y mostró la ausencia de diferencia significativa en lo referente al genotipo VL ( $p=0.498$ ). De acuerdo con lo anterior, el genotipo VV del polimorfismo de la posición 247 del gen de la  $\beta_2$ GPI podría influir de manera similar en la producción de los autoanticuerpos  $a\beta_2$ GPI en las dos variantes primarias del SaF (SaFP y SaF/CP). Debe destacarse que el 100% de los pacientes portadores del genotipo VV presentó títulos altos de  $a\beta_2$ GPI.

Tabla 23. Comparación de las frecuencias de alelos y genotipos de sujetos sanos y de pacientes con SaFP y SaF/CP con  $a\beta_2$ GPI

Genotipo	Frecuencias		
	Sanos	Pacientes con SaFP y SaF/CP $a\beta_2$ GPI (+) (24)	$a\beta_2$ GPI (-) (9)
VV	0.13 (14)	*0.37 (9) <sup>4</sup>	0.00 (0)
VL	0.52 (55)	*0.42 (10)	0.66 (6)
LL	0.35 (37)	<sup>†</sup> 0.21 (5)	0.33 (3)
		$\alpha=0.031$	
<b>Alelo</b>			
V	0.39 (83)	0.58 (28)	0.33 (6)
L	0.61 (129)	0.47 (20)	0.66 (12)
		$\alpha=0.038$	

En la prueba  $\chi^2$  las f.e. <5 fueron: 16.6% en genotipos y 0.0% en alelos.

\*  $p=0.014$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

<sup>†</sup>  $p=0.231$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos.

<sup>‡</sup>  $p=0.498$  para la comparación de VL versus VV+LL de pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus sujetos sanos

<sup>4</sup>  $p=0.039$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con  $a\beta_2$ GPI IgG versus pacientes sin  $a\beta_2$ GPI.



#### 7.4. Análisis de la asociación del alelo V en la posición 247 del gen de la $\beta_2$ GPI con la producción de anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI de isotipo IgG.

##### 7.4.1. Pacientes con SaF/CP y $\alpha\beta_2$ GPI

Para establecer la fuerza de la asociación del alelo V y su estado homocigoto (VV) con la presencia en suero de anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GPI en pacientes con SaF/CP, se calculó el riesgo relativo aproximado (RRA) (ver apéndice I), los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Riesgo relativo aproximado asociado a la presencia de valina en la posición 247 de la  $\beta_2$ GPI en pacientes con SaF/CP *versus* sujetos sanos

Comparación	Riesgo relativo aproximado (IC 95%)
Expresión del alelo V en pacientes con SaF/CP y $\alpha\beta_2$ GPI <i>versus</i> sujetos sanos	3.11 (1.12-8.60)
Genotipo VV <i>versus</i> genotipos VL+LL en pacientes con SaF/CP y $\alpha\beta_2$ GPI <i>versus</i> sujetos sanos	5.26 (1.26-21.97)

Los resultados muestran que el alelo V está asociado con la presencia de anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GPI en pacientes con SaF/CP. Así, los pacientes con SaF/CP que presentan el alelo V, tienen un riesgo relativo 3.11 veces mayor de tener  $\alpha\beta_2$ GPI que aquellos pacientes que poseen el alelo L. Aún más, en los pacientes homocigotos para el alelo valina (VV) el riesgo de presentar  $\alpha\beta_2$ GPI está incrementado 5.26 veces en comparación con los pacientes que poseen cualquiera de los otros dos genotipos posibles.

#### 7.4.2. Pacientes con variantes primarias del SaF y $\alpha\beta_2$ GPI

El grado de asociación del genotipo **VV** y del alelo **V** con la producción de  $\alpha\beta_2$ GPI en pacientes con alguna de las dos variantes primarias del SaF (SaFP y SaF/CP) se determinó con el RRA, los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Riesgo relativo aproximado asociado a la presencia de valina en la posición 247 de la  $\beta_2$ GPI en pacientes con SaFP y SaF/CP positivos para  $\alpha\beta_2$ GPI *versus* sujetos sanos

Comparación	Riesgo relativo aproximado (IC 95%)
Expresión del alelo V en pacientes con SaFP y SaF/CP $\alpha\beta_2$ GPI(+) <i>versus</i> sujetos sanos	<b>2.17 (1.15-4.11)</b>
Genotipo <b>VV</b> <i>versus</i> genotipos VL+LL en pacientes con SaFP y SaF/CP $\alpha\beta_2$ GPI(+) <i>versus</i> sujetos sanos	<b>3.94 (1.45-10.71)</b>

Como se mencionó anteriormente, al analizar los resultados de todos los pacientes con alguna variante primaria del SaF que presentan  $\alpha\beta_2$ GPI se encontró correlación con el alelo **V** y el genotipo **VV** (con riesgos relativos aproximados de 2.17 y 3.94, respectivamente); sin embargo, dicha asociación no es tan fuerte como en el caso del grupo de pacientes con SaF/CP (Tabla 24).

#### 7.5. Polimorfismo val/leu<sup>247</sup> del gen de la $\beta_2$ GPI y manifestaciones clínicas del SaF.

Se investigó la asociación del genotipo con las principales manifestaciones clínicas del SaF en 18 pacientes que pertenecían a alguna variante primaria del SaF (15 SaFP y 3 SaF/CP) previamente evaluados clínicamente por el personal médico del Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ. Las manifestaciones clínicas estudiadas fueron las siguientes: oclusión arterial (presente en 11 de los 18 pacientes), trombosis venosa (8/18), trombocitopenia (8/18), *livedo reticularis* (8/18),

pérdida fetal recurrente (4/18) y anemia hemolítica (0/18). De acuerdo con el análisis estadístico, existe diferencia significativa entre los pacientes con alguna variante primaria del SaF que presentan oclusión arterial (OA) y los controles sanos o los pacientes sin evidencia de OA ( $\alpha=0.006$  y  $0.028$  en genotipo y alelo, respectivamente). No se encontró asociación con ningún alelo en las otras manifestaciones clínicas estudiadas ( $p>0.390$ ).

Tabla 26. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas de sujetos sanos y de pacientes con alguna variante primaria del SaF y evidencia de OA.

Genotipo	Frecuencia		
	Sanos (106)	SaFP y SaF/CP con OA (11)	SaFP y SaF/CP sin OA (7)
VV	0.13 (14)	<sup>‡</sup> 0.54 (6)†	0.00 (0)*
VL	0.52 (55)	<sup>‡</sup> 0.27 (3)	0.71 (5)
LL	0.35 (37)	<sup>‡</sup> 0.18 (2)	0.29 (2)
		$\alpha=0.006$	
<b>Alelo</b>			
V	0.39 (83)	0.68 (15)	0.36 (5)
L	0.61 (129)	0.32 (7)	0.64 (9)
		$\alpha=0.028$	

En la prueba  $\chi^2$  las f.e. <5 fueron: 33.3% en genotipos y 0.0% en alelos.

<sup>‡</sup>  $p=0.003$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con OA versus sujetos sanos.

†  $p=0.038$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes con OA versus pacientes sin OA.

⊕  $p=0.332$  para la comparación de LL versus VL+VV en pacientes con OA versus sujetos sanos.

\*  $p=0.594$  para la comparación de VV versus VL+LL en pacientes sin OA versus sujetos sanos

<sup>‡</sup>  $p=0.204$  para la comparación de VL versus VV+LL de pacientes con OA versus sujetos sanos

La presencia de OA en pacientes con SaFP y SaF/CP se asoció con el genotipo VV ( $p=0.003$  y  $0.038$  en la comparación con sujetos sanos y pacientes sin OA, respectivamente), mas aún, el 100% de los pacientes con este genotipo que fueron evaluados clínicamente presentaron la manifestación clínica mencionada anteriormente

y tuvieron a $\beta_2$ GPI positivos (dato no mostrado). Los resultados del análisis estadístico muestran que en pacientes con SaFP y SaF/CP existe dependencia entre la oclusión arterial y el genotipo. Una vez establecido lo anterior, se calculó la fuerza de la asociación encontrada (Tabla 27). Es importante remarcar que no se encontró diferencia significativa en los resultados de pacientes sin OA y los sujetos sanos ( $p=0.594$ , para la comparación de VV versus VL+LL), ni tampoco en la frecuencia del genotipo VL en los sujetos sanos y en los pacientes con OA ( $p=0.204$ ).

Tabla 27. Riesgo relativo aproximado asociado a la presencia de valina en la posición 247 de la  $\beta_2$ GPI en pacientes con alguna variante primaria del SaF y evidencia de OA versus sujetos sanos

Comparación	Riesgo relativo aproximado (IC 95%)
Expresión del alelo V en pacientes con alguna variante primaria del SaF y oclusión arterial <i>versus</i> sujetos sanos	<b>3.33 (1.31- 8.44)</b>
Genotipo VV <i>versus</i> genotipos VL+LL en pacientes con alguna variante primaria del SaF y oclusión arterial <i>versus</i> sujetos sanos	<b>7.89 (2.15- 28.96)</b>

La correlación entre la oclusión arterial y el genotipo VV fue significativa y el RRa correspondiente fue de 7.89, el más alto de todo el estudio.

La evaluación clínica también se efectuó en 17 pacientes con SaFS, sin embargo no se encontró ninguna asociación con el polimorfismo estudiado.

## 8. Discusión

En este estudio, se analizó el polimorfismo genético de la  $\beta_2$ GPI correspondiente a la posición 247. Dicho polimorfismo, presente en sujetos sanos y en pacientes con SaF, es producto de la presencia de valina o leucina en la posición mencionada. El análisis del polimorfismo val/leu<sup>247</sup> permitió calcular las distribuciones de frecuencias genotípica y alélica en una muestra de la población mestiza mexicana. Las frecuencias encontradas en los genotipos correspondientes fueron VV (0.13), VL (0.52) y LL (0.35), mientras que los alelos mostraron la siguiente distribución: V (0.39) y L (0.61). Las frecuencias observadas en los genotipos se ajustan a las frecuencias esperadas del Equilibrio de Hardy-Weinberg<sup>86</sup> (VV=0.15, VL=0.48 y LL=0.37). Además, con las frecuencias observadas se determinó que el alelo que codifica para el aminoácido leucina es el alelo silvestre. Otro dato interesante es que el patrón de distribución de las frecuencias de los genotipos encontrado en la muestra estudiada es similar al reportado para la población Afroamericana (VV 0.24, VL 0.47, LL 0.29)<sup>84</sup>. Este no es el caso para las poblaciones Asiáticas y Caucásicas estudiadas<sup>84,85</sup> (Tabla 6). Tanto el tamaño de la muestra estudiada (106), como estas observaciones, dan consistencia a los resultados obtenidos. Sin embargo, es importante considerar que las frecuencias determinadas en la población mestiza mexicana se obtuvieron del análisis de sujetos voluntarios, es decir, corresponden a una muestra no probabilística. Ahora, si consideramos que la estadística inferencial se basa en la teoría de probabilidades, los datos obtenidos difícilmente se pueden generalizar a la población, ya que no se consideró a ésta ni en sus parámetros, ni en sus elementos para obtener la muestra. A pesar de lo anterior, la muestra obtenida y sus resultados son útiles para nuestro diseño

de estudio que, mas que una representatividad de elementos de una población, requiere de una cuidadosa y controlada elección de sujetos con ciertas características específicas que garantizan de cierto modo, una condición saludable de los mismos.

En lo concerniente a los individuos afectados por el padecimiento estudiado, los resultados muestran un aumento significativo, con respecto a los sujetos sanos y pacientes a $\beta_2$ GPI(-), en la frecuencia del alelo V en el grupo de pacientes mestizos mexicanos con SaFP y SaF/CP que presentan títulos altos de a $\beta_2$ GPI, lo que sugiere que la presencia de dicho alelo podría estar asociada con la producción de autoanticuerpos a $\beta_2$ GPI en ambos padecimientos ( $p=0.038$ ,  $RRa=2.17$ ; Tablas 23 y 25).

La participación del alelo V, reportada de igual forma en caucásicos con SaFP<sup>85</sup> y asiáticos con SaF<sup>84</sup>, es confirmada al observar que el genotipo VV se encontró también significativamente incrementado en el grupo de pacientes mexicanos afectados por cualquiera de las variantes primarias del SaF ( $p=0.014$ ,  $RRa=3.94$ ; Tablas 23 y 25). De acuerdo con lo anterior, en pacientes con SaFP o SaF/CP, la presencia homocigota del alelo V, confiere un mayor riesgo para la producción de autoanticuerpos a $\beta_2$ GPI, hallazgo que es consistente con la noción de que los cambios en la estructura de la  $\beta_2$ GPI propician la pérdida de la tolerancia con la consecuente producción de a $\beta_2$ GPI.

En otras palabras, la producción de autoanticuerpos es el resultado de la generación de  $\beta_2$ GPI antigénica producto de la presencia del aminoácido valina en la posición 247.

Sobre estos resultados, es importante recalcar que la participación del alelo V se hace evidente únicamente cuando se presenta de manera homocigota (VV), es decir, la diferencia entre el grupo de los pacientes con variantes primarias del SaF y los sujetos sanos no se debe a diferencias en el genotipo VL ( $p=0.498$ , Tabla 23), sino al mayor

número de casos con genotipo VV en el grupo de pacientes. La diferencia en la frecuencia del genotipo VV, pero no del VL, también se presentó en la población asiática estudiada por Hirose *et al*<sup>84</sup>. Estos hallazgos sugieren la necesidad de homocigocidad en dicha posición para que se genere una proteína antigénica y consecuentemente la respuesta autoinmune. Siendo así, al parecer el alelo V es recesivo con respecto al alelo L. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la expresión de los dos posibles alelos sea codominante, en este caso, el genotipo homocigoto resultaría en la producción de dos proteínas iguales, en lo que al polimorfismo estudiado se refiere, mientras que el estado heterocigoto (VL) sólo produciría una  $\beta_2$ GPI antigénica. Desde el punto de vista inmunológico, la generación de la respuesta inmune en contra de la variante que contiene el alelo V en la posición 247 puede darse teóricamente en los dos genotipos que contienen el alelo V, sin embargo, debido a que en el estado heterocigoto la concentración está reducida a la mitad, posiblemente la respuesta inmunológica en contra de la  $\beta_2$ GPI no sea tan efectiva. Otra explicación, aunque poco probable, pudiera ser la presencia de otras mutaciones en la  $\beta_2$ GPI que actuaran de manera antagonista en la generación de antigenicidad en dicha proteína.

Además de la asociación observada entre el genotipo VV y la producción de  $\alpha\beta_2$ GPI en el grupo de pacientes con SaFP y SaF/CP, de acuerdo con los resultados, en este grupo de pacientes también existe correlación entre la oclusión arterial y la presencia del aminoácido valina en la posición 247 de la  $\beta_2$ GPI ( $p=0.003$ ,  $RRAa=7.89$  con respecto al genotipo y  $p=0.009$ ,  $RRA=3.33$  con respecto al alelo). Es importante resaltar que todos los pacientes que presentaron oclusión arterial tuvieron

autoanticuerpos a $\beta_2$ GPI de isotipo IgG a títulos altos (6/6). Debe además destacarse el hecho de que la oclusión arterial es una de las principales manifestaciones clínicas del SaF, y que en el grupo estudiado fue la de mayor frecuencia(11/18).

Por lo dicho hasta el momento, existe evidencia de que la secuencia proteica de la  $\beta_2$ GPI que expresa el aminoácido valina en la posición 247 genera una conformación potencialmente antigénica en los pacientes con cualquiera de las variantes primarias del SaF (SaFP y SaF/CP). En los pacientes con SaF/CP dicho fenómeno fue más evidente, sin embargo, esto puede deberse al tamaño de la muestra de pacientes estudiados con esta entidad clínica (12 en total). Entonces, es posible que en pacientes con SaFP y SaF/CP los a $\beta_2$ GPI tengan el mismo origen, y puede considerarse que en las dos entidades el genotipo VV del polimorfismo 247 de la  $\beta_2$ GPI tiene consecuencias similares: es un factor relevante en la manifestación de dos de las principales características del fenómeno autoinmune estudiado, la producción de a $\beta_2$ GPI y la presentación de oclusión arterial.

Es importante observar que ninguna variante del SaF mostró distribuciones de frecuencias significativamente diferentes con respecto a los sujetos sanos. De acuerdo con lo anterior, no existe relación entre el polimorfismo de la  $\beta_2$ GPI estudiado y la enfermedad en su conjunto, lo que confirma que el SaF es el resultado de la interacción de varios factores. Aún así, debe considerarse que el análisis de los resultados de pacientes con SaF/CP mostró una tendencia de asociación con el genotipo VV muy cercana a la significatividad ( $p=0.086$ , Sección 7.2). Sin embargo, debe tenerse en cuenta el reducido número de pacientes estudiados con dicha variante del SaF (12).



La presencia de títulos altos de aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI tampoco se encontró asociada con ningún genotipo, lo cual puede deberse a que el ensayo para cuantificar dichos autoanticuerpos detecta anticuerpos con diversas especificidades, de entre los que destacan los que reconocen epitopos en el complejo  $\beta_2$ GPI-CL<sup>24</sup> y los que reaccionan con epitopos crípticos en la  $\beta_2$ GPI<sup>25</sup> y/o en la cardiolípinina<sup>31</sup>. Ahora, si consideramos que la mayor parte de los pacientes presentaron títulos altos de anticuerpos aCL "verdaderos" (Tabla 16), la búsqueda de asociación del polimorfismo estudiado con los anticuerpos aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI se torna complicada, ya que pacientes con títulos altos de aCL "verdaderos" podrían presentar un resultado positivo de aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI debido a la inespecificidad del ensayo señalada anteriormente. Lo anterior no sucede con los anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GPI que, además de asociarse de manera más fuerte con las manifestaciones clínicas del SaF que los aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI<sup>37</sup>, solamente reconocen epitopos presentes en la  $\beta_2$ GPI. No debe descartarse la posibilidad de que en pacientes con SaFP, existan anticuerpos que reconozcan a la  $\beta_2$ GPI en forma nativa y también cuando se presenta unida a superficies aniónicas, y entonces puedan ser detectados en los ensayos para  $\alpha\beta_2$ GPI y para aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI; es decir, que los epitopos que reconocen dichos anticuerpos no se modifiquen con la interacción de la  $\beta_2$ GPI con superficies con carga negativa como la cardiolípinina o la membrana de células endoteliales. Por otro lado, los  $\alpha\beta_2$ GPI de pacientes con SaF/CP reconocen solamente a la  $\beta_2$ GPI en estado nativo, es decir, no unida a cardiolípinina, posiblemente porque el epitopo de estos anticuerpos se encuentra bloqueado por la región hidrofóbica de la cardiolípinina.

Uno de los principales mecanismos de generación de trombosis en el SaF es el que propone la activación de eventos mediados por células<sup>58,62</sup>, mecanismo demostrado recientemente con la utilización de péptidos análogos a la  $\beta_2$ GPI<sup>58</sup>, y válido para los aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI y para los a $\beta_2$ GPI. En el caso de los a $\beta_2$ GPI, se ha propuesto también la existencia de un receptor de  $\beta_2$ GPI en las células endoteliales<sup>61</sup>, que acentuaría el papel de los a $\beta_2$ GPI en la generación de trombosis. Además, Visvanathan y McNeil demostraron recientemente la existencia de respuesta inmune celular en contra de la  $\beta_2$ GPI, purificada o presente en el suero de pacientes con SaF, que correlacionaba con las manifestaciones clínicas del SaF. Dicha inmunidad celular genera la aparición de una respuesta Th1 con la consecuente producción de Interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), el cual podría estar involucrado en las pérdidas fetales recurrentes y en los episodios trombóticos<sup>87</sup>.

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que la población de pacientes con alguna de las variantes primarias del SaF (SaFP y SaF/CP) y presencia de a $\beta_2$ GPI, es genéticamente distinta a la propia de los sujetos sanos respecto a la mutación estudiada. Ahora, si consideramos que no existe diferencia significativa entre las distribuciones de frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con SaFS o SaF/CS con respecto a los resultados obtenidos con los sujetos sanos, entonces, puede deducirse que también la población de pacientes con SaFS y SaF/CS es distinta genéticamente, en la posición estudiada, a la población de pacientes SaFP y SaF/CP. En otras palabras, mientras que para las variantes primarias del SaF (SaFP y SaF/CP), el genotipo VV es un factor de riesgo para la presencia de oclusión arterial y la producción de autoanticuerpos a $\beta_2$ GPI, para los pacientes con LEG y SaF no existe

evidencia de este fenómeno de asociación, lo que implica la participación de otros mecanismos de producción de los autoanticuerpos a $\beta$ <sub>2</sub>GPI. Es importante subrayar que los pacientes con SaFS y SaF/CS estudiados, son pacientes con LEG que, previamente al desarrollo del SaF presentaban una desregulación inmunológica importante, tienen además de las características clínicas y serológicas del SaF, la presencia de otros autoanticuerpos y otras patologías que dificultan evaluar el papel de un único factor en el desarrollo de la enfermedad. Aunado a lo anterior, existen diferencias genéticas entre las entidades primaria y secundaria del SaF que han sido documentadas. Tal es caso del estudio de los antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, del inglés Major Histocompatibility Complex) en donde, por un lado el SaFP ha sido asociado con la presencia de los alelos HLA-DQ7<sup>88,89</sup> y HLA-DRw53<sup>15,88,89</sup>, mientras que la presencia de aCL en pacientes con LEG se ha encontrado relacionada con los alelos HLA-DR7<sup>89,90</sup>, DR4 y DR53<sup>89</sup>. En la población mexicana también se han encontrado diferencias genéticas entre ambas entidades, las asociaciones del MHC con el SaFP y el SaFS, están relacionadas a los alelos HLA-DR5<sup>91</sup> y HLA-DR7<sup>90</sup>, respectivamente.

Existe evidencia de que la autoinmunidad es un fenómeno autosómico dominante<sup>89</sup>, sin embargo, en el SaF, a pesar de los resultados que muestran asociación con algún gen en particular, ningún estudio ha encontrado una correlación que muestre como causa directa del desarrollo del padecimiento, la presencia de un alelo particular o de un grupo de alelos. Aún así, dentro de las asociaciones reportadas tenemos al Factor C4 del complemento, cuya deficiencia alélica se encontró asociada con el SaFP<sup>89</sup>, y al genotipo homocigoto RR del gen de la Paraoxonasa 1 que se ha

encontrado significativamente incrementado en pacientes con títulos altos de aCL y trombosis arterial<sup>92</sup>. Es importante mencionar que la Paraoxonasa 1 ejerce un papel protector contra la modificación oxidativa de las LDL y el desarrollo de aterosclerosis. Por otro lado, otros factores genéticos no han mostrado correlación con el SaF, tal es el caso del polimorfismo en la posición 20210 del gen de la protrombina<sup>93,94</sup>, la mutación del Factor V (Leiden), el polimorfismo en la posición 677 de la metilén-tetrahidrofolato reductasa<sup>94</sup> y el polimorfismo en el intrón 16 del gen de la enzima convertidora de angiotensina<sup>95</sup>. La suma de todos estos resultados y la visión global del problema sugieren que el análisis simultáneo de múltiples polimorfismos, en uno o varios genes de moléculas asociadas al SaF e inclusive del MHC, mediante microarreglos de ADN podría establecer con una mayor claridad el grado de contribución del factor genético en la enfermedad.

Sin embargo, en nuestro caso, independientemente del polimorfismo de la  $\beta_2$ GPI, los aminoácidos que componen su estructura están genéticamente codificados, y por lo tanto debería existir tolerancia inmunológica para cualquier variante expresada por un individuo. Por lo anterior, no es claro el porqué la presencia de cualquiera de los dos aminoácidos en la posición 247 y el posible cambio conformacional que ocasionan se asocien con una respuesta autoinmune. Parece necesario entonces la participación de otros factores, probablemente relacionados con la reactividad de las células T, los cuales podrían ser críticos en la pérdida de la tolerancia. Posiblemente, en individuos susceptibles, en donde la susceptibilidad dependería de la genética de los mismos, la presencia de infecciones permitiría el procesamiento de proteínas exógenas con epitopos similares a los de la  $\beta_2$ GP-I, estimulando así, células T autoreactivas. Este mecanismo se ha documentado en un modelo murino<sup>96</sup>. Al respecto se tiene que

considerar que aunque la diferencia estructural entre el aminoácido valina y su homólogo leucina es solamente la presencia de un metileno (-CH<sub>2</sub>-) extra en este último (Figura 3), la sustitución de leucina por valina altera la estereoquímica de la proteína, afectando principalmente la región localizada entre el dominio IV y V que se estabiliza por el puente de hidrógeno entre los aminoácidos lisina<sup>246</sup> (dominio V) y ácido aspártico<sup>193</sup> (dominio IV)<sup>57</sup>. Como resultado del cambio estereoquímico en la  $\beta_2$ GP-I, posiblemente se origina la exposición de una región con homología a estructuras ajenas, presentes en algunos microorganismos o en contaminantes ambientales. Si esto es cierto, al generarse una respuesta inmune en contra de dichas estructuras ajenas, la  $\beta_2$ GPI participaría también como un posible blanco para el sistema inmunológico. Ahora bien, dado que la inyección de  $\beta_2$ GPI en ratones induce la aparición de aFL,  $\alpha\beta_2$ GPI y manifestaciones clínicas de SaF<sup>97</sup>, la respuesta inmune generada en contra de la  $\beta_2$ GPI podría ser el activador de la producción de autoanticuerpos y de las consecuencias de los mismos.

La participación de factores ambientales en la etiología de las enfermedades autoinmunes<sup>98</sup> incluyendo el SaF ha sido sugerida<sup>58,99-101</sup>. En el SaF, se ha demostrado la presencia de secuencias peptídicas de los dominios IV, III y I de la  $\beta_2$ GPI en virus, bacterias y parásitos<sup>58,98</sup>. En el grupo de virus con secuencias con alta homología con epitopos de la  $\beta_2$ GPI están: citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus de Epstein-Barr y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>58</sup>. En el caso de las bacterias las especies son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Shigella dysenteriae*, entre otras<sup>58</sup>. Mas aún, secuencias peptídicas con homología al sitio de unión a fosfolípidos encontradas en algunos virus se han utilizado para producir

péptidos sintéticos que, cuando se han empleado como inmunógenos en ratones, han sido capaces de inducir la producción de aCL y a $\beta_2$ GPI<sup>99</sup>.

Por último, cabe señalar que los términos utilizados en la descripción del síndrome merecen ser examinados con cuidado. A partir de 1990, se hizo evidente que los inexactamente llamados cofactores tienen un papel protagónico dentro del SaF<sup>24-26</sup>. Históricamente, la denominación cofactor se acuñó desde los primeros estudios que demostraron la participación de proteínas plasmáticas en el reconocimiento de los aFL, sin embargo, actualmente se acepta que los autoanticuerpos asociados con el SaF reconocen principalmente epitopos localizados en las estructuras proteicas; asociadas con fosfolípidos, o en forma nativa, por lo que hoy en día la denominación propuesta en un inicio es ambigua. Debido a lo anterior, el término Síndrome anti-fosfolípido debe ser modificado. En 1996, Cabral et al propusieron una nueva denominación para el padecimiento: Síndrome anti-fosfolípido/cofactor<sup>38,39</sup>. Con este nuevo nombre se intentó agrupar todas las posibles variantes de la enfermedad en función de la familia de autoanticuerpos presentes, sin embargo, el nuevo término, no solamente no mejoró el nombre anterior, sino que lo tornó aún más confuso. Además, en el INCMNSZ la nueva terminología es utilizada solamente para referirse a aquellos pacientes con a $\beta_2$ GPI y ausencia de aCL, por lo que el objetivo principal, tener un solo nombre que abarque todas las variantes, no ha sido alcanzado.

## Conclusiones

- 1) Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo val/leu<sup>247</sup> del gen de la  $\beta_2$ GPI en una muestra de la población mestiza mexicana son VV(0.13), VL(0.52), LL(0.35) y V(0.39), L(0.61), respectivamente. Las frecuencias están en Equilibrio de Hardy-Weinberg y el alelo silvestre es el que codifica para el aminoácido leucina.
- 2) Los resultados muestran que el alelo V del polimorfismo val/leu<sup>247</sup> es recesivo.
- 3) En pacientes mexicanos con las variantes primarias del SaF (SaFP y SaF/CP) existe correlación entre la presencia homocigota del alelo V en la posición 247 del gen de la  $\beta_2$ GPI y la producción de autoanticuerpos a $\beta_2$ GPI. Dicho estado homocigoto confiere además, un mayor riesgo de padecer oclusión arterial por lo que puede ser relevante en el seguimiento de estos pacientes.
- 4) En SaFS y SaF/CS, el polimorfismo val/leu<sup>247</sup> de la  $\beta_2$ GPI no tuvo efecto en la producción de los a $\beta_2$ GPI lo que sugiere que en estos pacientes el mecanismo que origina la producción de dichos autoanticuerpos es diferente al correspondiente a las entidades primarias del SaF.
- 5) El método empleado en la detección de los a $\beta_2$ GPI permite sugerir que el epitopo que genera la conformación antigénica en la  $\beta_2$ GPI y que se ve afectado por el polimorfismo val/leu<sup>247</sup> no es críptico.

- 6) Los datos presentados muestran que en las variantes primarias del SaF, el sistema  $\beta_2$ GPI/a $\beta_2$ GPI participa directamente en el mecanismo de generación de trombosis.
  
- 7) Independientemente de las manifestaciones clínicas y serológicas, ninguna variante del SaF presentó correlación con algún genotipo del polimorfismo del gen de la  $\beta_2$ GPI en la posición 247. Tampoco se encontró correlación entre dicho polimorfismo y la presencia de anticuerpos aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI.
  
- 8) El factor genético juega un papel importante en las variantes primarias del SaF. Sin embargo, deben existir también otros factores, posiblemente el ambiental y el inmunológico que, junto con el factor genético, interactúan para la manifestación de dichas enfermedades.



## Bibliografía

1. Vyse TJ and Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* **1996**; 85: 311-318.
2. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunol* **2001**; 2(9):777-780.
3. Cepellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuses. *Proc Soc Exp Biol Med* **1957**; 76: 572-574.
4. Bowie EJW, Thomson JH, Pascuzzi CA, et al. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *Journal of Clinical Investigation* **1963**; 62:416-430.
5. Alarcón-Segovia D, Cabral AR. The anti-phospholipid antibody syndrome: clinical and serological aspects. *Bailliers Best Prat Res Clinical Rheumatology* **2000**; 14:139-150.
6. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease and lupus anticoagulant. *Br Med J* **1983**; 187: 1088-1089
7. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *Journal of Rheumatology* **1986**; 13: 486-489.
8. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D, Sanchez-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.
9. Alarcón-Segovia D. And Cabral A.R. The concept and classification of antiphospholipid/cofactor syndromes. *Lupus* **1996**; 5:364-7.
10. Alarcon-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary Antiphospholipid Syndrome. *J Rheumatol* **1989**; 16:482-488.
11. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the Antiphospholipid syndrome within Systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **1992**; 21(5): 275-286.
12. Cunningham AJ. Large number of cells in normal mice produce antibody components of isologous erythrocytes. *Nature* **1974**; 252:749-751.
13. Cabiedes J. Anticuerpos anti-fosfatidilcolina como anticuerpos naturales. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. **1993**.
14. Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, Khamashta MA, Hughes GRV. Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* **1992**; 35:124-125.
15. Alarcón-Segovia D. Pathogenic potential of anti-phospholipid antibodies. *J Rheumatol* **1988**; 15: 890-893.
16. Shoenfeld Y, Teplizki HA, Mendlovic S, Blank M, Mozes E, Icenberg DA. The rol of de Human anti-DNA idotype 16/6 in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* **1989**; 51: 313-325.
17. Shoenfeld Y, Mozes E. Pathogenic idiotypes of autoantibodies in autoimmunity: lessons from new experimental models of SLE. *FASEB J* **1990**; 4:2646-2651

18. Ruiz-Argüelles A, Vazquez-Prado J, Tenorio-Mendoza C, et al. Anti-idiotypic activity of antiphospholipid antibodies I. Goat antibodies to human coagulation protein C express idities recognized by "natural" and "pathologic" human antiphospholipid antibodies. (Enviado)
19. Canoso RT, Sise HS. Chlorpromazine induced lupus anticoagulant in chlorpromazine-patients. *Am J Hematol* **1982**; 13:121-129.
20. Dubois EL, Tallman E, Wonka RA, Chlorpromazine induced systemic lupus erythematosus. Case report and review of the literature. *J Amer Med Assoc* **1972**; 221:595-596.
21. Colaco CB, Mackie IJ, Irving W, Machin SJ. Anticardiolipin antibodies in viral infection. *Lancet* **1989**;1:622.
22. Vismara A, Meroni PL, Tincani A, et al. Relationship between anticardiolipin and endotelial cell antibodies in sistemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* **1988**; 74:247-253.
23. Hasselaar P, Derksen RHW, Blokzijl L, De Groot PG. Thrombosis associated with antiendothelial cell antibodies cannot be explained by effects on endothelial and platelet prostanoid synthesis. *Thromb Haemostas* **1988**; 59:80-85 .
24. McNeil PH, Simpson RJ, Chesterman CN, et al, Antiphospholipid antibodies are directed against complex antigen that include a lipid binding inhibitor of coagulation:  $\beta_2$ -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**;87: 4120-4124
25. Galli M, Comfurius F, Maasen C, et al .Anticardiolipin antibodies directed not to cardioliipin but to plasma protein cofactor. *Lancet* **1990**; 335:1544-1547.
26. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, et al. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease (letter). *Lancet* **1990**; 336:177-178.
27. Sugi, T, McIntyre JA. Autoantibodies to phosphatidylethanolamina (PE) recognize a kiningen-PE complex. *Blood* **1995**; 86:3083-3089.
28. Lévy RA, Avvad E, Oliveira J, Porto LC. Placental pathology in antiphospholipid síndrome. *Lupus* **1998**; suppl 2:S81-85.
29. Saika C, Lambert M, Caron C, et al. Low prevalence of anti-annexin V antibodies in antiphospholipid síndrome with fetal loss. *Rev Med Interne* **1999**; 20:762-765.
30. Rand JH, Wu XX, and Giesen P. A possible solution to the paradox of the "lupus anticoagulant": antiphospholipid antibodies accelerate thrombin generation by inhibiting annexin-V. *Thromb Haemost* **1999**; 84:1376-1377.
31. Harris EN, Pierangeli S. What is the "true" antigen for antiphospholipid antibodies (letter). *Lancet* **1990**; 336:1550.
32. Borchman D, Harris EN, Pierangeli SS, Lambda OP. Interactions and molecular structure of cardioliipin and  $\beta_2$ -glycoprotein 1 ( $\beta_2$ GP-1). *Clin Exp Immunol* **1995**; 102:373-378.
33. Subang R, Levine JS, Janeff AS, et al. Phospholipid-bound  $\beta_2$ -Glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. *Journal of autoimmunity* **2000**; 15:21-32.
34. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett D, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize  $\beta_2$ Glycoprotein I structure altered by interacting with an oxigen modified solid phase surface. *J. Exp. Med* **1994**;179: 457-462.
35. Voet D, Voet JG. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A., España. **1990**. Pag. 297.

36. Gharavi AE. Antiphospholipid cofactor. *Stroke* **1992**; 23:17-10
37. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus patients associate more strongly with anti- $\beta_2$ -glycoprotein I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* **1995**; 22: 2233-2237.
38. Cabral AR, Amigo MC, Cabiedes J and Alarcón-Segovia D. The antiphospholipid/cofactor syndromes: A primary variant with antibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid Assays. *Am J Med* **1996**; 101:472-481.
39. Alarcón-Segovia D, Mestanza M, Cabiedes J and Cabral AR. The antiphospholipid/cofactor syndromes. II. A variant in systemic lupus erythematosus patients with antibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assay. *J Rheumatol* **1997**; 24:1545-1551.
40. Shultze HE, Heide K, Haupt H. Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares  $\beta_2$  globulin des human serums. *Naturwissen Schäften* **1961**; 48: 719.
41. Polz E, Kostner GM. The binding of  $\beta_2$ -glycoprotein-I to human serum lipoproteins. *FEBS Lett* **1979**; 102:183-186.
42. Nakaya Y, Schaefer EJ, Brewer HB Jr. activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein-I). *Biochem Biophys Res Commun* **1980**; 95:1168-1172.
43. Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma  $\beta_2$ -glycoprotein-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**; 81:3640-3644.
44. Medi H, Jun M, Steel DM, et al. Nucleotide sequence and expression of the human gene encoding apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I). *Gene* **1991**; 108:293-298.
45. Steinkasserer A, Estaller C, Weiss EH, et al. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human  $\beta_2$ -glycoprotein-I. *Biochem J* **1991**; 277:387-391.
46. Kato H, and 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**; 30:11687-11694.
47. Bendixen E, Halkier T, Magnusson S, et al. Complete primary structure of bovine  $\beta_2$ -glycoprotein I: location of the disulfide bridges. *Biochemistry* **1992**; 31:3611-3617.
48. Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of  $\beta_2$ -glycoprotein I critical for the lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc Natl Acad Sci* **1993**; 90:2141-5
49. Hunt J, Krilis S. The fifth domain of  $\beta_2$ glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* **1994**; 152:653-659.
50. Shen Y, Krilis SA, Sali A. Site-directed mutagenesis of recombinant human  $\beta_2$ -glycoprotein I. Effect of phospholipid binding and anticardiolipin antibody activity. *Ann N Y Acad Sci* **1997**; 815:331-3.
51. Smith EM, Victoria E, Marquis D. Regions in domain 1 of  $\beta_2$ GP-I that are important in the binding of anti-cardiolipin autoantibodies. (Abstract). *Lupus* **1998**, (Suppl 27): S176.

52. Marquis D, Victoria E, Iverson GM.  $\beta_2$ GP-I-dependent anticardiolipin autoantibodies recognize an epitope on the first domain of  $\beta_2$ GP-I. (Abstract). *Lupus* **1998**, (Suppl 2)7:S176.
53. Mc Neeley PA, Victoria E, Marquis D, Crisologo JF, Tuyay DC, Linnik MD. APS patient sera preferentially recognize the first domain of  $\beta_2$ Glycoprotein I. (Abstract). *Lupus* **1998**, (Suppl 2)7:S176.
54. Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, et al. Molecular studies on phospholipid-binding sites and cryptic epitopes appearing on  $\beta_2$ -glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus* **1995**;4:S13-S17.
55. Kasahara H, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Kobayashi S, Koike T. Identification of epitopes of anticardiolipin antibodies by screening phage random peptide. (Abstract). 5<sup>th</sup> Conference of Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* **1998**; 7:66.
56. Koike T, Ichikawa K, Atsumi T, Tsutsumi A, Matsuura E. Epitopes on  $\beta_2$ GPI recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus* **1998**;7:S14-S17.
57. Yamamoto D, Matsuura E, Kaihara K, et al. Three dimensional modeling of  $\beta_2$ -glycoprotein I and electrostatic interactions between its domains IV and V. (Abstract). *Lupus* **1998**, (Suppl 2)7:S174.
58. Blank M, Shoenfeld Y, Cabilly S, Heldman Y, Fridkin M, Katzir K. Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides. *Proc Natl Acad sci USA* **1999**; 96:5164-5168.
59. Schousboe I.  $\beta_2$ glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* **1985**; 66:1086-1091
60. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Beta2-glycoprotein I (apo H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis* **1987**; 63: 109-14.
61. Roubey RAS. Mechanisms of autoantibody-mediated trombosis. *Lupus* **1998**; (Suppl 2) 7: S114-S119.
62. Lockshin MD. Pathogenesis of the antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus*. **1996**; **5**:404-408.
63. Vaarala O. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis. *Lupus* **1996**; **5**:442-447.
64. Shoenfeld Y, Hartas D, George J. Atherosclerosis and the antiphospholipid syndrome. A link unraveled? *Lupus* **1998**; (Suppl 2) 7: S140-S143.
65. Matsuura E and Koike T. Accelerated atheroma and anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies. *Lupus* **2000**; 9:210-216.
66. Steinkasserer A, Cockburn DJ, Black DM, et al. Assignment of apolipoprotein H (APOH:  $\beta_2$ -glycoprotein I) to human chromosome 17q23qter; determination of the major expression site. *Cytogenet Cell Genet* **1992**; 60:31-33.
67. Cleve H. Genetics studies on the deficiency of  $\beta_2$ -glycoprotein I of human serum. *Humangenetik* **1968**; 5:294-304.
68. Roychoudhury AK, Masatoshi N:  $\beta$ 2-glycoprotein I, Bg system: BG. In Human polymorphic genes. World distribution. New York. Oxford University, **1988**:139-140.
69. Kamboh MI, Ferrell RE, and Sepehrnia B. Genetic studies of human apolipoproteins. IV. Structural heterogeneity of apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I). *Am J Hum Genet*. **1988**; **42**:452-457.

70. Eichner JE, Kuller RE, Ferrel RE, Kamboh MI. Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles. IV. Apolipoprotein polymorphisms in a small group of black women from healthy women study. *Genet. Epidemiol* **1989**; 6:681-689.
71. Sefhernia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, et al. Genetic studies of human apolipoproteins. VIII. Role of apolipoprotein H polymorphisms in relation to serum lipoprotein concentrations. *Hum. Genet.* **1989**; 82:118-122.
72. Kamboh MI, Bunker CH, Aston CE, Nestlerode CS, McAllister AE, Ukoli FA. Genetic association of five apolipoprotein polymorphisms with serum lipoprotein-lipid levels in African blacks. *Genetic Epidemiology* **1999**; 16: 205-222.
73. Sangera DK, Kristensen T, Hamman RF, et al. Molecular basis of the apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) protein polymorphism. *Hum Genet* **1997**; 100:57-62.
74. Kamboh MI, Serjeantson SW, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. XVIII. Apolipoprotein polymorphisms in Australian aborigines. *Human Biology* **1991**; 63(2):179-186.
75. Kamboh MI, Crawford MH, Aston CE, Leonard WR. Population distributions of APOE, APOH, and APOA4 polymorphisms and their relationships with quantitative plasma lipid levels among the Evenki herders of Siberia. *Human Biology* **1996**; 68(2):231-243.
76. Richter A, Cleve H. Genetic variations of human  $\beta_2$ -glycoprotein I demonstrated by isoelectric focusing. *Electrophoresis* **1988**; 9:317-322.
77. Saha N, Kamboh MI, Kelly LJ, Ferrel RE, Tay JSH. Apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) polymorphisms in Asians. *Human Biology* **1992**; 64(4):617-621.
78. Kamboh MI, Wagenknecht DR, McIntyre JA. Heterogeneity of the apolipoprotein H\*3 allele and its role in affecting the binding of apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein-I) to anionic phospholipids. *Hum Genet* **1995**; 95: 385-388.
79. Steinkasserer A, Dorner C, Wurzner R, et al. Human  $\beta_2$ -glycoprotein I: molecular analysis of DNA and amino acid polymorphism. *Hum Genet* **1993**; 91:401-402.
80. Sangera DK, Wagenknecht DR, McIntyre JA, Kamboh MI. Identification of structural mutations in the fifth domain of apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) which affect phospholipid binding. *Hum Mol Genet* **1997**; 6:311-316.
81. Weber M, Hayem G, DeBrant M, Palazzo E, Roux S, Kahn MF, Meyer O. The family history of patients with primary or secondary antiphospholipid syndrome (APS). *Lupus* **2000**; 9:258-263.
82. Kamboh MI, Mehdi H. Genetics of apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) and anionic phospholipid binding. *Lupus* **1998**; (Suppl 2) 7:S10-S13.
83. Kamboh MI, Manzi S, Mehdi H, et al. Genetic variation in apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) affects the occurrence of antiphospholipid antibodies and apolipoprotein H concentrations in Systemic lupus erythematosus. *Lupus* **1999**; 8:742-750.
84. Hirose N, Williams R, Alan R, et al. A role for the polymorphism at position 247 of the  $\beta_2$ -glycoprotein I gene in the generation of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis and rheumatism* **1999**; 42:1655-1661.
85. Atsumi T, Tsutsumi A, Amengual O, et al. Correlation between  $\beta_2$ -glycoprotein I valine/leucine<sup>247</sup> polymorphism and anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* **1999**; 38:721-723.

86. Mange A, Mange EJ: Population and quantitative genetics. In Genetics: Human Aspects. Sinauer associates, Inc. **1990**: 405-416.
87. Visvanathan S and McNeil HP. Cellular immunity to  $\beta_2$ -glycoprotein I in patients with the Antiphospholipid Syndrome. *J Immunol* **1999**; 162:6919-6925.
88. Cuadrado MJ, Camps MT, Ocon P, Sánchez-Lora J, Guil M, de Ramon E. Genetic differences between primary and secondary antiphospholipid syndrome. (Abstract). *Lupus* **1996**; 5:510.
89. Wilson WA and Gharavi AE. Genetic risk factors for aPL syndrome. *Lupus* **1996**; 5:398-403.
90. Granados J, Vargas-Alarcón G, Drenkard C, et al. Relationship of anticardiolipin antibodies and antiphospholipid syndrome to HLA-DR7 in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus* **1997**; 6:57-62.
91. Vargas-Alarcón G, Granados J, Bekker C, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. Association of HLA-DR5 (possibly DRB1\*1201) with the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients. *Arthritis Rheum* **1995**;38:1340-1341.
92. Lambert M, Boullier A, Hachula E, et al. Paraoxonase activity is dramatically decreased in patients positive for anticardiolipin antibodies. *Lupus* **2000**; 9:299-300.
93. Bertolaccini ML, Atsumi T, Hunt BJ, Amengual O, Khamastha MA, Hughes GRV. Prothrombin mutation is not associated with thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. (Abstract). 5<sup>th</sup> Conference of Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* **1998**; 7:45
94. Bentolila S, Ripoll L, Drouret L, Crassard I, Tournier-Lasserre E, Piette JC. Common prothrombotic genetic factors are additional risk for thrombosis in men with primary antiphospholipid syndrome (PAPS). (Abstract). 5<sup>th</sup> Conference of Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* **1998**; 7:46
95. Lewis NM, Katsumata K, Atsumi T, et al. An evaluation of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of arterial thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis and rheumatism* **2000**; 43:1655-1656
96. Mamula MJ, Lin R-H, Janeway ChA, and Hardin JA. Breakin T cell tolerance with foreign and self co-immunogens. A study of autoimmune B and T cell epitopes of cytochrome c. *J Immunol* **1992**; 149:789-795.
97. Gharavi AE, Samaritano LR, Wen J, Elkon EB. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with  $\beta_2$  Glycoprotein I (apolipoprotein H). *J Clin Invest* **1992**; 90:1105-9.
98. Shoenfeld Y, Gharavi A, Koike T.  $\beta_2$ GP-I in the anti phospholipid (Hughes') syndrome –from a cofactor to an autoantigen- from induction to prevention of antiphospholipid syndrome. *Lupus* **1998**; 7:503-506.
99. Chou T-NK, Hsu T-C, Chen R-M, Lin L-I and Tsay GJ. Parvovirus B19 infection associated with the production of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) and anticardiolipin antibody (aCL). *Lupus* **2000**; 9: 551-554.
100. Gharavi AE, Tang H, Gharavi E, Wilson WA. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with viral peptides. *Arthritis Rheum* (abstract). **1996**; 39:S319.

101. Celli CM, Gharavi EE, Vivian W, Chaimovich H, Gharavi AE. Viral peptides are associated to  $\beta_2$ Glycoprotein-I phospholipid binding site peptide by 3D-conformation and membrane interactions (Abstract). *Lupus* **1998**, (Suppl 2):S177.
102. Berenson ML, Levine DM. Estadística para administración y economía. Conceptos y aplicaciones. McGraw-Hill. México, **1991**.314-334.
103. Lloyd D, Fisher GVB. Biostatistics. A methodology for the health sciences. John Wiley&Sons, Inc. U.S.A, **1993**. 185-209.

## Apéndice I.

### Pruebas estadísticas empleadas en el análisis de los resultados<sup>103,104</sup>.

#### a) Prueba $\chi^2$ (Ji cuadrada)

La Ji cuadrada es una prueba estadística para evaluar hipótesis acerca de la relación entre dos variables categóricas. Se calcula por medio de una tabla de contingencia o tabulación cruzada, la cual es una tabla de dos dimensiones en donde cada dimensión contiene una variable, cada variable se subdivide en dos o más categorías (Tabla 28). En dicha tabla se anotan las frecuencias observadas (f.o.) en la muestra de investigación.

	Variable 1	Variable 2	Total renglón
Categoría 1	$n_{11}$	$n_{21}$	$n_{C1T}$
Categoría 2	$n_{12}$	$n_{22}$	$n_{C2T}$
Total columna	$n_{V1T}$	$n_{V2T}$	$n_{TOTAL}$

Tabla 28. Tabla de contingencia.

Posteriormente se calculan las frecuencias esperadas (f.e.) para cada celda de la siguiente manera:

$$f.e. = (\text{Total o marginal de renglón}) * (\text{total o marginal de columna}) / n_{TOTAL}$$

La Ji cuadrada es una comparación entre la tabla de frecuencias observadas y la denominada tabla de frecuencias esperadas. La prueba parte del supuesto de "no relación entre variables".

Una vez obtenidas las f.e. se aplica la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum (f.o. - f.e.)^2 / f.e.$$

La prueba Ji proviene de una distribución muestral, denominada distribución  $\chi^2$ , y los resultados obtenidos en la muestra están identificados por los grados de libertad. Esto es, para saber si un valor de  $\chi^2$  es o no significativo, es necesario calcular los grados de libertad, procedimiento que se realiza con la siguiente fórmula:

$$g.l. = (r-1)(c-1)$$

En donde g.l. son los grados de libertad, r el número de renglones y c el número de columnas.



Una vez determinado el valor de  $\chi^2$  y los grados de libertad se calcula el valor de  $\alpha$ .

$$\alpha = \int_{\chi^2}^{\infty} \frac{1}{2} \Gamma(g.l./2) \chi^{g.l./2 - 1} e^{-\chi^2/2} d\chi^2$$

Donde  $\Gamma$  es la función Gama. La función anterior no se puede integrar de manera explícita por lo que para resolverla es necesario usar métodos numéricos de integración. Sin embargo, mediante las hojas de cálculo de Microsoft Excel es posible calcular el valor de  $\alpha$  si se conoce el valor de  $\chi^2$  y los grados de libertad escribiendo: =DISTR.CHI(valor de  $\chi^2$ , g.l.).

En la prueba Ji cuadrada se parte del supuesto de que las frecuencias esperadas de cada celda tienen un valor mayor a 5. Esta suposición es importante principalmente para las tablas de contingencias 2X2 que tiene sólo un grado de libertad. En los casos en donde más del 20% de las celdas no satisficieron dicha suposición se utilizó la Prueba exacta de Fisher para el análisis estadístico de los resultados.

#### b) Prueba exacta de Fisher

La prueba exacta de Fisher permite calcular la probabilidad exacta de observar un conjunto particular de frecuencias en una tabla 2X2. La hipótesis nula postula que la probabilidad de la presencia de un determinado factor es la misma en las dos poblaciones en estudio. El análisis estadístico se realizó a través del programa informático SPSS versión 10.0.

#### c) Riesgo Relativo aproximado

El riesgo relativo aproximado (RRa) es una medida del grado de asociación entre dos variables dicotómicas; es decir, variables que solamente pueden tener dos resultados. Las variables involucradas son la enfermedad y la exposición a un factor determinado. En realidad el RRa compara dos proporciones (la proporción con enfermedad) en dos poblaciones: aquellas expuestas o no al factor mencionado. Seleccionado dicho factor, la probabilidad de padecer la enfermedad es:

$$P\{\text{enfermedad} + / \text{factor} +\} / P\{\text{enfermedad} - / \text{factor} +\}$$

El RRa se define como:

$$RRa = \frac{P\{\text{enfermedad} + / \text{factor} +\} / P\{\text{enfermedad} - / \text{factor} +\}}{P\{\text{enfermedad} + / \text{factor} -\} / P\{\text{enfermedad} - / \text{factor} -\}}$$

De acuerdo con la Tabla 28 el cálculo sería el siguiente:

$$RRa = \frac{[n_{11}/n_{11}+n_{21}] / [n_{21}/n_{11}+n_{21}]}{[n_{12}/n_{12}+n_{22}] / [n_{22}/n_{12}+n_{22}]}$$

$$RRA = \frac{n_{11}n_{22}}{n_{21}n_{12}}$$

Para establecer la precisión de la estimación realizada se calcula el intervalo de confianza. El procedimiento consiste en la construcción del intervalo de confianza para el  $\ln RRA$ , es decir, el logaritmo natural del  $RRA$ , y después el resultado se eleva utilizando el número  $e$  como base.

El intervalo de confianza al  $100(1-\alpha)\%$  esta dado por:

$$\ln RRA \pm Z_{1-\alpha/2} \sqrt{1/N_{11} + 1/N_{12} + 1/N_{21} + 1/N_{22}}$$

La razón de usar logaritmos para el cálculo del intervalo de confianza estriba en que el  $\ln RRA$  tiene una distribución mas normalizada que el  $RRA$ .

## **Apéndice II.**

### **Criterios de clasificación de pacientes con SaF.**

#### **a) Síndrome anti-fosfolípido primario<sup>10</sup>**

Dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas:

- Trombosis venosa
- Oclusión arterial
- Pérdida fetal recurrente
- Trombocitopenia
- Anemia hemolítica
- *Livedo reticularis*
- Mielitis transversa
- Ulceras en las piernas

Y

Niveles elevados de aCL dependientes de  $\beta_2$ GPI o aFL "verdaderos" (IgG o IgM > 5 desviaciones estándar por encima de la media de los controles) o anticoagulante lúpico.

Los pacientes no deben presentar evidencia de LEG o de otra enfermedad de tejido conjuntivo.

#### **b) Síndrome anti-fosfolípido/cofactor primario<sup>11</sup>**

Pacientes con manifestaciones clínicas de SaFP y títulos altos de a $\beta_2$ GPI de isotipo IgG pero sin presencia de aFL "verdaderos" o aFL dependientes de factor proteico.

Los pacientes no deben presentar evidencia de LEG o de otra enfermedad de tejido conjuntivo.

c) Síndrome anti-fosfolípido secundario a LEG<sup>38</sup>.

Definitivo:

Dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas:

- Trombosis venosa
- Oclusión arterial
- Pérdida fetal recurrente
- Trombocitopenia
- Anemia hemolítica
- *Livedo reticularis*
- Úlceras en las piernas

Y

Niveles elevados de aFL, "verdaderos" o dependientes de factor proteico (IgG o IgM > 5 desviaciones estándar por encima de la media de los controles) o anticoagulante lúpico.

Probable:

Una manifestación clínica y títulos elevados de aFL o,

Dos o más manifestaciones clínicas y títulos bajos de aFL (IgG o IgM > 2 ≤ 5 desviaciones estándar)

d) Síndrome anti-fosfolípido/cofactor secundario a LEG<sup>39</sup>.

Pacientes con manifestaciones clínicas de SaFS y títulos altos de a $\beta_2$ GPI de isotipo IgG pero sin presencia de aFL "verdaderos" o aFL dependientes de factor proteico.