

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA**  
**IGNACIO CHÁVEZ**



**DEPARTAMENTO DE REUMATOLOGÍA**

***EFFECTO DEL SUERO DE PACIENTES CON SÍNDROME DE ANTICUERPOS  
ANTIFOSFOLÍPIDO PRIMARIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE  
ADHESIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**LAURA ALINE MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

**ASESORA:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN AMIGO**

**CO-ASESORES:**

**DR. LUIS JAVIER JARA QUEZADA**

**DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES**

**MÉXICO D.F. OCTUBRE 2006**



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.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Reumatología del Instituto Nacional de Cardiología bajo la dirección de la doctora María del Carmen Amigo Castañeda

Se llevo a cabo con la colaboración del Laboratorio Multidisciplinario de la Sección de Postgrado de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y la Unidad de Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social con la co-dirección de los doctores Guillermo Manuel Ceballos Reyes y Luis Javier Jara Quezada respectivamente.

---

Dra. María del Carmen Amigo Castañeda  
Profesora adjunta del curso de especialización en Reumatología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Médico adjunto del Servicio de Reumatología del  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez  
Presidenta del jurado y asesora de tesis

---

Dr. Luis Javier Jara Quezada  
Jefe de la Unidad de Investigación de la  
Unidad Médica de Alta Especialidad La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Co-asesor de tesis

---

Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes  
Coordinador del Programa de Doctorado en Investigación Médica de la  
Sección de Postgrado de la Escuela Superior de Medicina del  
Instituto Politécnico Nacional  
Co-asesor de tesis

---

Dr. José Fernando Guadalajara Boo  
Director de Enseñanza del  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez  
Secretario del jurado

---

Dr. Manuel Martínez-Lavín  
Titular del curso de especialización en Reumatología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Jefe del Servicio de Reumatología del  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez  
1<sup>er</sup> Vocal del jurado



---

Dr. Luis Humberto Silveira Torre  
Médico adjunto del Servicio de Reumatología del  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez  
2º Vocal del Jurado

---

Dr. Carlos Javier Pineda Villaseñor  
Subdirector de Investigación del  
Centro Nacional de Rehabilitación  
3<sup>er</sup> Vocal

# **1. DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a los pacientes del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, a los pacientes del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza y todos los pacientes que contribuyeron a mi formación.

A Rosy, Julio y David.

A mi familia biológica y urbana.

Ustedes saben quienes son la familia, siempre están ahí, apoyando.

GRACIAS

## **2. A G R A D E C I M I E N T O S**

A la doctora Mary Carmen Amigo, para quien no tengo palabras para expresar mi profunda gratitud por la dirección de este trabajo, por el adiestramiento clínico diario, y por ser una gran mujer que enseña con ejemplo a trabajar duro, constante, con el justo equilibrio entre la fortaleza y el toque delicado que sólo usted puede imprimir en quienes la rodean.

Gracias por tocar mi vida.

Al doctor Guillermo Ceballos y Luis Javier Jara por la co-dirección de este trabajo y su confianza en mi, también han dirigido mi vida en el sentido correcto.

Al doctor Manuel Martínez-Lavín, al doctor Luis H. Silveira, al doctor Carlos Pineda, al doctor Rafael Bojalil, Luis Amezcua y Angie por darme las facilidades de aprender a mi ritmo a pesar de las canas verdes que alguna vez he causado a más de uno de ustedes. Muchas gracias por ser mis maestros.

A Isabel, Carlos, Sary, Pily, Betina, Guillermina, Dina, Cecilia, Javier, Miguel Angel, Alejandra, Cecy, Lety, Marisol, Oscar, Israel, Faby, Jaeli, Brenda, y Paco por su amistad y apoyo.

A Gustavo Cassano por dejarme saber que mi vida puede ser el sueño de alguien.

iii Mi infinita gratitud !!!

### **3. INDICE**

1. Dedicatorias.....	9
2. Agradecimientos.....	10
3. Indice.....	11
3.1. Indice de figuras.....	13
3.2. Indice de tablas.....	14
3.3. Indice de gráficas.....	15
4. Resumen en Inglés.....	16
5. Resumen.....	17
6. Introducción.....	18
7. Antecedentes.....	19
7.1. Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.....	19
7.2. Tratamiento del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.....	23
7.3. Anticuerpos antifosfolípidos.....	24
7.4. Moléculas de adhesión celular.....	26
7.5. Endotelio, moléculas de adhesión celular y anticuerpos antifosfolípidos.....	27
8. Planteamiento del problema.....	29
9. Justificación.....	30
10. Pregunta de investigación.....	31
11. Objetivo.....	32
12. Hipótesis.....	33
13. Metodología.....	34
13.1. Características del lugar donde se realizó el estudio.....	34
13.2. Diseño.....	34
13.3. Población.....	34
13.4. Criterios de selección.....	34
13.5. Descripción de variables.....	35
13.5.1. Variable independiente.....	35
13.5.2. Variable dependiente.....	35

13.5.3.	Variables confusoras.....	36
13.6.	Descripción operativa del estudio.....	37
13.6.1.	Obtención del cultivo primario.....	37
13.6.2.	Mantenimiento de la línea celular.....	38
13.6.3.	Estimulación celular.....	38
13.6.4.	Inmunocitoquímica.....	38
13.6.5.	Datos clínicos y niveles séricos de anticuerpos antifosfolípidos, lípidos, biometría hemática, química sanguínea, pruebas de coagulación y funcionamiento hepático.....	39
13.7.	Método de observación.....	40
13.8.	Tamaño de la muestra.....	40
13.9.	Análisis estadístico.....	41
14.	Aspectos éticos.....	42
15.	Resultados.....	43
15.1.	Efecto del suero de los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario sobre la expresión de molécula de adhesión vascular – 1.....	43
15.2.	Efecto del suero de los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario sobre la expresión de molécula de adhesión intercelular -1.....	46
15.3.	Datos clínicos de los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido y sujetos controles.....	49
16.	Discusión.....	55
17.	Conclusiones.....	59
18.	Glosario.....	60
19.	Bibliografía.....	61

### **3.1 INDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	
Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero control con inmunocitoquímica para VCAM-1.....	44
Figura 2.	
Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero SAF con inmunocitoquímica para VCAM-1.....	44
Figura 3.	
Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero control con inmunocitoquímica para ICAM-1.....	47
Figura 4.	
Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero SAF con inmunocitoquímica para ICAM-1.....	47

## **3.2 INDICE DE TABLAS**

Tabla 1.	
Efecto del suero control y del suero SAF sobre la expresión de VCAM-1.....	43
Tabla 2.	
Efecto del suero control y del suero SAF sobre la expresión de ICAM-1.....	46
Tabla 3.	
Datos demográficos y somatométricos de los pacientes con SAF y controles.....	49
Tabla 4.	
Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con SAF.....	51
Tabla 5.	
Ventajas y desventajas de este modelo in vitro de SAF.....	58



### **3.3 INDICE DE GRÁFICAS**

Gráfica 1.	
Efecto del suero control y SAF en la expresión de VCAM-1 medida por Inmunocitoquímica.....	45
Gráfica 2.	
Efecto del suero control y SAF en la expresión de ICAM-1 medida por inmunocitoquímica.....	48
Grafica 3.	
Comorbilidad de los pacientes con SAF.....	53
Grafica 4.	
Tratamiento médico en los pacientes con SAF.....	54

## **4. ABSTRACT**

### **EFFECT OF PRIMARY ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME'S SERUM ON CELL ADHESION MOLECULES EXPRESSION FROM HUMAN ENDOTHELIAL CELLS.**

Antiphospholipid antibodies (aPL) are directed against a wide variety of cell surface components, membrane phospholipids and endothelial cells. aPL activate endothelium by inducing a pro-inflammatory and procoagulant phenotype. These antibodies are able to activate endothelial cells by adhesion molecules expression. We evaluate the effect of serum from primary antiphospholipid syndrome (PAPS) patients on vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC).

HUVEC monolayer culture from healthy women was obtained. Endothelial cells were exposed to PAPS and healthy controls serum. VCAM-1 and ICAM-1 expression was measured semi- quantitatively by immunocytochemistry and expressed as pixel/area.

PAPS serum enhanced VCAM-1 and ICAM-1 expression on HUVEC in 96% and 79% respectively in comparison with healthy controls serum.

VCAM-1 pixel/area values from PAPS and controls were  $136.3 \pm 20.7$  vs  $69.3 \pm 14.3$  respectively. ICAM-1 pixel/area values were  $158.7 \pm 25.2$  vs  $88.0 \pm 12.1$  for PAPS and controls.

Our results confirm that aPL stimulate the endothelium through adhesion molecules expression. This in vitro model will allow us to study the impact of various treatment modalities over the expression of molecules involved in endothelial activation.

## **5. RESUMEN**

### **EFFECTO DEL SUERO DE PACIENTES CON SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDO PRIMARIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES.**

El suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario (SAFP) contiene anticuerpos antifosfolípidos (aPL) contra gran variedad de componentes de la superficie celular, fosfolípidos de membrana, células endoteliales, etc. Estos anticuerpos son capaces de activar las células endoteliales mediante expresión de moléculas de adhesión.

Evaluamos el efecto del suero de pacientes con SAFP sobre la expresión de molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en células de endotelio vascular umbilicales humanas (HUVEC).

Se realizó cultivo monocapa HUVEC de mujeres sanas. Las células endoteliales fueron expuestas a suero de sujetos sanos y a suero de pacientes SAFP. La expresión de VCAM-1 e ICAM-1 fue evaluada semicuantitativamente con inmunocitoquímica y expresada en pixeles/área de imágenes digitalizadas.

El suero de SAFP aumento la expresión basal de VCAM-1 e ICAM-1 en 96% y 79% respectivamente en comparación con los sujetos sanos.

La expresión de VCAM-1 en sujetos sanos y SAFP fue de  $69.3 \pm 14.3$  vs  $136.3 \pm 20.7$  pixeles/área y en el caso de ICAM-1 fue de  $88.0 \pm 12.1$  vs  $158.7 \pm 25.2$  pixeles/área respectivamente.

Nuestros resultados confirman que los anticuerpos aPL estimulan el endotelio a través de la expresión de moléculas de adhesión. Este modelo in vitro nos permitirá estudiar el impacto de varias modalidades de tratamiento sobre la expresión de moléculas de adhesión involucradas en la activación endotelial.

## **6. INTRODUCCIÓN**

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) es la principal trombofilia en el área reumatológica. Se asocia a eventos de trombosis tanto arterial como venosa y a ciertas condiciones de morbimortalidad obstétrica. Los eventos trombosis y condiciones obstétricas constituyen criterios clínicos para su diagnóstico, pero se debe documentar también la presencia de anticuerpos antifosfolípidos circulantes en los pacientes.

Actualmente hay evidencia de procesos de aterosclerosis acelerada en los pacientes con SAF. Se ha propuesto que existen fenómenos de activación endotelial como mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolípidos. Este conocimiento proviene de algunos estudios in vitro que utilizan modelos roedores de SAF ó bien un número escaso de pacientes.

Por otro lado el tratamiento actual de los pacientes con SAF va encaminado a evitar los factores de riesgo para trombosis, y desde el punto de vista farmacológico se utiliza aspirina para prevención primaria y anticoagulantes orales para prevención secundaria.

Dado que existen otras condiciones clínicas del SAF involucradas con la función endotelial como aterosclerosis acelerada y progresión de valvulopatía para las cuales la anticoagulación oral no ha mostrado beneficios es importante continuar el desarrollo de modelos in vitro que puedan evaluar de manera inicial el potencial beneficio de otros fármacos.

En este trabajo nos proponemos explorar el efecto del suero total de los pacientes con SAF mediante la evaluación semicuantitativa de dos moléculas de adhesión celular involucradas con activación endotelial: molécula de adhesión vascular – 1 y molécula de adhesión intercelular -1.

## **7. ANTECEDENTES**

### **7.1. SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDO**

El síndrome de anticuerpos antifosfolípido (SAF) es una enfermedad multisistémica en donde prevalece un estado de hipercoagulabilidad, las características clínicas más reconocidas son los eventos trombóticos, pérdidas fetales recurrentes y trombocitopenia.

El SAF es una causa común de trombofilia adquirida, por lo menos representa unos 35 000 casos nuevos de trombosis venosa asociada a SAF y 5 000 nuevos casos de trombosis arterial (1). Durante el embarazo se incrementan los factores procoagulantes, como el fibrinógeno, factores de la coagulación V, VII, VIII y factor de Von Willebrand. Además, existe una reducción de la proteína S con resistencia adquirida a la proteína C, de tal manera que favorece un estado procoagulante para evitar excesivo sangrado durante en parto. Así, esto favorece la tendencia a coagulación en condiciones fisiológicas, las cuales hay que diferenciar de un estado procoagulante patológico. En el caso del SAF se ha asociado la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aPL) hasta en 27% al evaluar el estado protrombótico durante el embarazo en pacientes con datos clínicos de tromboembolismo venoso, tales como éstasis venosa, cambios de coloración y daño vascular en comparación con pacientes embarazadas sin datos clínicos de tromboembolismo (2).

La presencia de aPL eleva el riesgo de presentar recurrencia de eventos trombóticos de 3 a 10 veces (1) y se han asociado a 37% de los eventos tromboembólicos por enfermedad valvular coronaria, en comparación a 11% en los pacientes con enfermedad valvular cardiaca que no tienen aPL (3).

A pesar del reconocimiento de la importancia clínica de los anticuerpos antifosfolípidos desde trabajos reportados en 1983, fue hasta 1988 en Sapporo, Japón, en donde los criterios clasificatorios del SAF se propusieron en el 8avo. Simposio Internacional de Anticuerpos Antifosfolípidos. El SAF se define por los criterios de Sapporo en criterios clínicos y de laboratorio (4).

Los criterios clínicos se dividen en trombosis vascular y criterios obstétricos.

Los eventos de trombosis vascular incluyen uno ó más episodios de trombosis venosa ó arterial, ó trombosis de vasos pequeños confirmada por estudios de imagen ó histopatología en cualquier órgano con excepción de trombosis venosa superficial.

Se consideran tres condiciones como criterios obstétricos:

- 1) Una ó más muertes inexplicables dentro de las 10 primeras semanas de gestación (SDG) con feto con morfología normal.
- 2) Uno ó más partos prematuros después de la 34<sup>a</sup> SDG con producto morfológicamente normal debido a preeclamsia, eclampsia ó insuficiencia placentaria severa.
- 3) Tres ó más abortos espontáneos inexplicables consecutivos antes de las 10 SDG habiendo excluido como causas anomalías maternas anatómicas ó metabólicas, así como paternas.

En los criterios de laboratorio se consideran las siguientes 2 situaciones:

- 1) Demostrar la presencia de anticuerpos anticardiolipinas IgG ó IgM presentes por lo menos en 2 ocasiones con 6 semanas de diferencia, medido por ensayo enzimático estandarizado inmunoabsorbente (ELISA) para anticuerpos anticardiolipina (aCL) dependientes de beta 2 glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI).
- 2) Evidenciar la presencia de anticoagulante lúpico (AL) medido en 2 ocasiones por lo menos con 6 meses de diferencia, demostrando coagulación prolongada dependiente de fosfolípidos. Ésta última se realiza demostrando la prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada, tiempo de coagulación con kaolina, tiempo con dilución de veneno de víbora de Russell, tiempo de protrombina ó tiempo de texarin. También se requieren las siguientes condiciones: la falta de corrección del tiempo de coagulación prolongado cuando se mezcla con plasma normal repletado de plaquetas; acortamiento ó corrección del tiempo de coagulación prolongado con la adición de exceso de fosfolípido; así como la exclusión de otras causas de coagulopatías, como heparina ó inhibidor del factor VII. Para considerar que el SAF se encuentra presente en un individuo por lo menos debe cumplir un criterio clínico y un criterio de laboratorio (4).

Existen otras características clínicas y de laboratorio que se pueden presentar en estos pacientes además de los criterios de Sapporo. Tales características clínicas son livedo reticularis, trombocitopenia, usualmente de 50 000 a 100 000 plaquetas/mm<sup>3</sup>, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad valvular cardiaca, mielopatía y síndromes similares a esclerosis múltiple, síndromes neurológicos no focales, corea, síndrome de oclusión vascular catastrófico ó también llamado SAF catastrófico, hipertensión arterial pulmonar y falla renal por microangiopatía trombótica. Las características de laboratorio y gabinete que también se pueden encontrar son las siguientes: anticuerpos anticardiolipinas del tipo inmunoglobulina A, anticuerpos anti  $\beta$ 2GPI, anticuerpos anti fosfatidilserina, anti fosfatidilinositol, anti fosfatidilglicerol, anti fosfatidiletanolamina, proteinuria, pruebas de hemoaglutinación para sífilis falsas positivas y lesiones hiperintensas en la fase T2 en resonancia magnética de cráneo.

Dadas las múltiples manifestaciones clínicas del SAF recientemente se han revisado los criterios de Sapporo en el 11° Congreso Internacional de Anticuerpos Antifosfolípidos en Sydney, Australia (5).

En esta revisión, dentro de los criterios clínicos de trombosis vascular se considera la presencia o ausencia de factores adicionales para trombosis estableciendo los subgrupos a y b respectivamente en este criterio clínico.

Actualmente, también se incluye en los criterios de laboratorio la determinación de anti  $\beta$ 2GPI, tanto isotipo IgG como IgM, y la determinación de laboratorio de los aCL, AL ó anti  $\beta$ 2GPI se debe realizar a las 12 semanas en vez de 6 semanas de diferencia.

En estos criterios modificados se establecen 4 tipos de SAF con base en los criterios de laboratorio cumplidos:

Tipo I: más de un criterio de laboratorio presente en cualquier combinación.

Tipo II a: presencia aislada de AL

Tipo II b: presencia aislada de aCL

Tipo II c: presencia aislada de anti B2GPI

En los criterios de Sapporo revisados además se consideran las manifestaciones del SAF más frecuentes, aún cuando no pueden ser consideradas estrictamente

para su diagnóstico, tales como, enfermedad valvular cardiaca, livedo reticularis, trombocitopenia, neuropatía, manifestaciones neurológicas, aCL isotipo IgA, anti B2GP1 isotipo IgA, anticuerpos anti fosfatidilserina, anticuerpos anti fosfatidiletanolamina, anticuerpos antiprotrombina aislada, y anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina-protrombina. Estas manifestaciones en particular se revisaron estableciendo criterios específicos para cada una.

El SAF se puede presentar en forma conjunta a enfermedades autoinmunes sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, entre otras, en tal circunstancia se denomina secundario. Cuando no se encuentra evidencia de otra enfermedad autoinmune sistémica asociada se denomina como SAF primario (6).

Los pacientes con SAF que también son portadores de lupus eritematoso sistémico y los pacientes con SAF primario tienen perfiles clínicos similares aunque hay algunas diferencias. Las valvulopatías, anemia hemolítica autoinmune, complemento C4 bajo y neutropenia son más comunes en los pacientes con SAF secundario a lupus eritematoso sistémico que en los pacientes con SAF primario. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el lupus existe un contexto más amplio de autoinmunidad y por ello no sólo participan los anticuerpos antifosfolípidos en la patogénesis del estado procoagulante ya que hay otros anticuerpos y sistemas alterados dependiendo del grado de afectación del lupus. Por estas diferencias clínicas y fisiopatológicas se debe establecer en primer lugar la interacción del endotelio y anticuerpos antifosfolípidos considerando SAF primario, sin asumir que ambos procesos son iguales.

Una de las condiciones más severas del SAF es el SAF catastrófico. Éste se define como una afectación sistémica con trombosis en tres o más órganos desarrollándose simultáneamente en un periodo de tiempo menor a una semana con confirmación histopatológica y presencia de anticuerpos antifosfolípidos que amenaza la vida (7). La mortalidad de esta variante fluctúa alrededor del 45%. Independientemente del desenlace mortal del SAF catastrófico, los sobrevivientes tienen complicaciones dependiendo de los territorios afectados por los eventos trombóticos y esto repercute en su calidad de vida.



## **7.2. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS**

El tratamiento del SAF en general está encaminado a evitar las complicaciones tromboticas y eliminar los factores de riesgo trombotico que los pacientes ya tienen. Se recomienda la práctica regular de ejercicio, reducción de peso, reducción de niveles de colesterol cuando estos están por arriba de valores normales y evitar el tabaquismo para disminuir otros factores de riesgo para trombofilia aunado a tratamiento anticoagulante (1, 8, 9).

El tratamiento farmacológico actual del SAF está dirigido a reducir el riesgo de eventos tromboembólicos. La mayoría de estudios clínicos se basan en el uso de aspirina como profilaxis primaria para trombosis, así como heparina y aspirina en combinación en pacientes embarazadas (1). Si bien la profilaxis secundaria requiere el empleo de anticoagulación oral por tiempo indefinido, aún se encuentra controvertido el valor óptimo de índice de anticoagulación (INR, international index ratio). En un estudio reciente en pacientes con SAF se mostró que el nivel alto de anticoagulación oral definido como INR de 3.0 a 4.0, no era superior en la prevención de eventos tromboticos comparados con pacientes con anticoagulación de intensidad moderada (INR 0.2-3.0) y sin cambios significativos en los eventos adversos hemorrágicos (8).

El uso de corticoesteroides e inmunomoduladores aún se encuentra con menor evidencia clínica que apoyen su uso en los pacientes con SAF (8, 9), especialmente en los pacientes que tienen SAF secundario, ya que generalmente se enfocan a aliviar los síntomas del proceso reumatológico subyacente, pero no se han mostrado efectos bien comprobados respecto a su eficacia en el proceso trombotico.

En el SAF también se ha encontrado disminución en los mecanismos de regulación del estrés oxidativo, por lo que se sugiere por algunos autores el uso de vitaminas, aprovechando sus propiedades antioxidantes como tratamiento adjunto a estos pacientes (9).

Definitivamente el tratamiento con anticoagulantes orales es necesario en estos pacientes. Sin embargo, no es totalmente efectivo y sus riesgos son altos, por lo que se deberán explorar nuevos tratamientos adyuvantes por el momento.

### 7.3. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Los anticuerpos antifosfolípidos constituyen un grupo heterogéneo de anticuerpos circulantes principalmente dirigidos contra componentes de tipo fosfolípido cargados negativamente. Se dividen en 2 grupos principalmente: los anticuerpos anticardiolipinas (aCL) y el anticoagulante lúpico (AL). Recientemente se ha agregado como marcador del SAF la determinación de anticuerpos anti  $\beta$ 2GP1, así como otros anticuerpos dirigidos contra protrombina, proteína C, proteína S, activador tisular de plasminógeno, anexina V, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina, trombomodulina, factor XII, cininógenos de alto y bajo peso molecular, factor VII/VIIIa y componentes del complemento H y C4b.

Clínicamente los pacientes que presentan AL tienen resultados no valorables en las pruebas de coagulación ya que interfiere con sus resultados (6), reaccionando paradójicamente con los eventos de trombofilia observados en los ensayos clínicos (10). Los posibles mecanismos que pueden explicar los efectos de los aPL implican que los aPL pueden unirse en forma cruzada a componentes de las membranas celulares y producir activación celular. También pueden alterar las reacciones hemostáticas dependientes de fosfolípidos mediante la unión a la superficie celular de células inflamatorias y células endoteliales modificando la expresión de moléculas de adhesión (1, 6, 10, 11) y secreción de citocinas proinflamatorias.

Se propone que a causa de la elevación persistente de anticuerpos aPL presentes en los pacientes se puede producir activación ó daño endotelial. El proceso inicia con la activación ó apoptosis de plaquetas, células endoteliales ó trofoblastos, cuando se encuentra la molécula de fosfatidilserina cargada negativamente. Así la  $\beta$ 2GP1 se une a la fosfatidilserina y se inicia la cascada de activación celular que permite la expresión de moléculas de adhesión. La expresión de este tipo de moléculas favorece la formación de agregados plaquetarios y desencadena la trombosis. A nivel placentario, los anticuerpos antifosfolípidos están dirigidos contra fosfatidilserina y un anticoagulante placentario natural, la anexina V, interrumpiendo un mecanismo natural encaminado a proteger al feto de los efectos protrombóticos de la madre en gestación. In vitro se ha comprobado que los

anticuerpos antifosfolípidos inducen la expresión de moléculas de adhesión y la consecuente adherencia de leucocitos al endotelio (1, 10, 11).

Otro mecanismo mediante el cual se ha encontrado un papel que sugiere la asociación entre un fenómeno trombótico y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos es la reciente evidencia de una asociación entre un proceso de aterosclerosis acelerada y anticuerpos antifosfolípidos, considerando la aterosclerosis como un proceso inflamatorio ó autoinmune. Hasta el momento hay evidencia de que los aPL tienen actividad cruzada con lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada y ésta se une por medio de macrófagos, favoreciendo el proceso de aterosclerosis a nivel de la placa aterosclerosa. Por otro lado, en modelos con roedores se presenta aterosclerosis acelerada cuando hay exposición a la  $\beta$ 2GP1.

La paroxonasa es una enzima con actividad antioxidante, se encuentran formando parte de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y actualmente se ha relacionado disminución de su actividad en presencia de aPL tanto en pacientes con SAF secundario a lupus como primario.

En estos pacientes hay IgG anti HDL e IgG anti  $\beta$ 2GP1 (10).

En el SAF se propone que también hay un desequilibrio del estrés oxidativo, de tal manera que la lipoperoxidación de lípidos, que es un marcador de estrés oxidativo, se encuentra aumentado (6, 11).

Respecto a la medición de aPL se pueden expresar en forma semicuantitativa según el Simposio Internacional sobre Anticuerpos Antifosfolípidos, considerando para IgG/IgM como valores positivos bajos (5-15/<6.0), positivos medios (15-80/6-50), ó altos positivos (>80/>50unidades), respectivamente.

El concepto de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos seronegativo no existe, pero por el contrario si se pueden encontrar valores positivos bajos de anticuerpos antifosfolípidos positivos en población sana hasta en un 2%. Estas personas son asintomáticas, es decir, sin evidencia clínica de SAF y hasta el momento la conducta depende de los factores de riesgo asociados a cada paciente. Por lo general ameritan seguimiento estrecho posterior y profilaxis con aspirina a dosis bajas (1, 6).

#### **7.4. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR**

Desde principios de siglo pasado se observó que al disociar mecánicamente las células de dos especies diferentes de esponjas marinas, y colocar en medio líquido una mezcla de ellas, éstas se reunían nuevamente formando las mismas esponjas originales. Esto demostró que las células de un organismo se reconocen entre sí y tiende a adherirse. Las moléculas responsables de este fenómeno son denominadas "Moléculas de Adhesión Celular" (CAM, término anglosajón). Estas moléculas son un conjunto muy complejo cuyas funciones van más allá del simple reconocimiento y adherencia celular, ya que se encuentran involucradas en procesos fisiológicos y fisiopatológicos (13).

Las moléculas de adhesión celular son glicoproteínas ubicadas en la superficie celular, las cuales tienen interacciones específicas célula-célula. Estas glicoproteínas tienen en un extremo un grupo carboxilo, el llamado carboxi-terminal, que se encuentra fijo en el citoplasma y en el cito-esqueleto. Inmediatamente después del carboxi-terminal se encuentra la región transmembrana, que atraviesa la membrana celular. El resto de la glicoproteína se ubica extracelularmente y termina en un grupo amino, el amino-terminal que da la especificidad a la molécula para unirse a otras moléculas de adhesión. De acuerdo al número de cadenas las moléculas de adhesión pueden ser monoméricas, formadas por una sola cadena glicoproteína, diméricas constituidas por dos cadenas idénticas y heterodiméricas, en las cuales ambas cadenas son diferentes. Existen cinco familias estructurales de moléculas de adhesión: cadherinas, moléculas del supergen de las inmunoglobulinas, integrinas, selectinas, y proteoglicanos. La molécula de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) pertenecen a la familia del supergen de inmunoglobulinas. El tiempo que tarda la expresión de estas moléculas de adhesión varía de 12 a 48 horas, ya que se requiere el proceso de síntesis de proteínas. Se considera que este hecho es parte del proceso de activación de la célula endotelial, el cual tiene un papel importante en la fisiopatología de SAF por

estar directamente involucradas en los procesos inflamatorios, trombóticos y aterosclerosis de esta enfermedad (13).

### **7.5. ENDOTELIO, MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR Y ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS**

Las células endoteliales al recubrir la vasta superficie del interior del sistema cardiovascular en el organismo, se encuentran como interfase inmediata para el desarrollo de procesos fisiológicos y patológicos (14). El endotelio como tal realiza múltiples funciones: está involucrado en la regulación de la coagulación, adhesión leucocitaria, en la inflamación, control del tono vascular, de crecimiento de músculo liso vascular y actúa también como una barrera transvascular al flujo de líquidos y solutos. Lejos de ser un participante pasivo de estos efectos, es un tejido dinámico, secretando y modulando sustancias vasoactivas, influenciando el comportamiento de otros tipos celulares y regulando la producción y composición de la matriz extracelular. Así, las funciones antitrombóticas en la célula endotelial incluyen la producción de óxido nítrico, prostaciclina, factor activador de plasminógeno tisular y proteoglicanos similares a heparina, trombosmodulina e inhibidor del factor de activación tisular (1). En el caso de los pacientes con SAF, el endotelio tiene un papel importante en la patogenia de la trombofilia (1, 10, 11, 15), no sólo por alteración de los mecanismos de hemostasia, si no por su interacción en procesos que favorecen la aterosclerosis. En condiciones normales se ha sugerido que la presencia de  $\beta$ 2GPI en la superficie endotelial tiene un papel en el transporte de lipoproteínas hacia la célula endotelial. Recientemente se ha encontrado evidencia de arterosclerosis temprana en los pacientes con SAF primario, manifestada por engrosamiento de la capa media e íntima de las arterias carotídeas (16), es probable que se asocie con enfermedad vascular cerebral. Se ha encontrado también que algunos aPL son capaces de reaccionar en forma cruzada con LDL oxidada la cual es importante en el desarrollo de la aterosclerosis (13, 17, 18). Por otro lado, se ha encontrado que la  $\beta$ 2GPI puede permitir ó facilitar la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de la célula endotelial como VCAM-1, ICAM-1 y selectina E, todas proteínas de

membrana cuya función es facilitar la migración celular de células inflamatorias hacia capa la intima y media de la estructura vascular en el proceso de la aterosclerosis (10, 11, 15, 17, 19).

Existen ya modelos animales en los cuales se han desarrollado proteínas capaces de producir SAF en roedores a partir de la inoculación de citomegalovirus y la inducción de anticuerpos antifosfolípidos mediante esta infección (20). Además en modelos in vitro se han documentado efectos patogénicos de aPL en cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) manifestados por la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y selectina E detectadas por ELISA y reportando de 7 a 24% mayor adhesión leucocitaria en dichos cultivos (21).

## **8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El tratamiento actual de SAF se ha enfocado a evitar los eventos de trombosis, mediante el uso de aspirina y anticoagulantes orales como recursos más ampliamente aceptados. Actualmente, existe evidencia de que en el SAF se presenta aterosclerosis acelerada y que los factores de riesgo tradicionales de riesgo cardiovascular no son tan precisos para determinar el riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con enfermedades inmunológicas como lupus eritematoso sistémico y el mismo SAF. Esto sugiere que en los pacientes con SAF no sólo existe alteración en la hemostasia, si no que también se encuentran involucrados mecanismos que favorecen la aterosclerosis como un proceso autoinmunitario. Por ello es importante disponer de modelos preclínicos en donde se puedan evaluar alternativas farmacológicas de tratamiento y de esta manera su uso racional.

## **9. JUSTIFICACIÓN**

Dado que actualmente se dispone de modelos in vitro con material biológico animal ó bien con un escaso número de pacientes y que es prioritario explorar alternativas de tratamiento farmacológico para algunas condiciones clínicas relacionadas con activación endotelial como aterosclerosis acelerada y progresión de valvulopatías, las cuales a pesar de tratamiento anticoagulante no tienen mejoría, es necesario determinar de manera inicial el efecto de nuevos fármacos a nivel endotelial.

En este trabajo se propone un modelo in vitro de SAF con células endoteliales humanas estimuladas con material biológico humano, tanto de individuos sanos como pacientes con SAF para evaluar la expresión de moléculas de adhesión y de esta manera proponer el uso racional de nuevos tratamientos farmacológicos



## **10. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el efecto del suero total de pacientes con SAF primario sobre la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 de células endoteliales humanas en cultivo?

## **11. OBJETIVO**

Determinar el efecto del suero total de pacientes con SAF primario en la expresión de VCAM-1 e ICAM1 en células endoteliales humanas en cultivo monocapa.

## **12. HIPÓTESIS**

El suero de pacientes con SAF primario es capaz de inducir un aumento en la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales humanas en cultivo monocapa en comparación con el suero de individuos sanos.

## **13. METODOLOGIA**

### **13.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS LUGARES EN DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO**

Esta investigación se realizó en las instituciones involucradas (INC-IMSS-IPN). El reclutamiento de los pacientes con SAF se llevó a cabo en el Servicio de Reumatología del INC y de la UMAE La Raza. En el Laboratorio multidisciplinario de la sección de Postgrado de la ESM se llevaron a cabo las técnicas de biología molecular y cultivo endotelial necesarios para el desarrollo de esta investigación.

### **13.2 DISEÑO**

Es un estudio experimental in vitro, transversal, abierto, comparativo con grupo control.

### **13.3 POBLACION**

- Grupo SAF:
  - Los sujetos elegibles fueron hombres ó mujeres mayores de 18 años con diagnóstico de SAF primario según los criterios de Sapporo.
- Grupo Control:
  - Donadores de sangre segura mayores de 18 años pareados por edad y sexo que aceptaron participar en el estudio como sujetos del grupo control cuando acudieron a donar sangre después de ser aceptados para donación de acuerdo a la norma oficial mexicana para donación de sangre segura.

### **13.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN**

- Criterios de Inclusión
  - Hombre y mujeres mayores de 18 años con diagnóstico de SAF de acuerdo a los criterios de Sapporo para el grupo SAF.
  - Consentimiento informado por escrito.

- Criterios de No inclusión
  - Procesos infecciosos de menos de 30 días, al momento de su inclusión al proyecto.
  - Tratamiento concomitante con estatinas, antiácidos, resinas ligadoras de ácidos biliares, ciclosporina, daptomicina, ezetimibe, fenofibrato, gemfibrozil, lovastatina/niacina, rifampicina.
  - Falta de apego a tratamiento anticoagulante si es que lo tienen considerándose como fuera de rango de anticoagulación cuando tenían INR menor a 2 ó bien mayor a 4
  - Nivel de anticoagulación fuera de rangos terapéuticos al momento de la toma de la muestra sanguínea (INR, menor a 2 ó mayor a 4).
- Criterios de Exclusión
  - No aplicaron para este estudio pivote.

## **13.5. DESCRIPCION DE VARIABLES**

### **13.5.1. VARIABLE INDEPENDIENTE**

- Suero: SAF ó Control.
  - Tipo: cualitativa dicotómica.
  - Escala: nominal.
  - Valores: SAF o control.
  - Descripción operativa: se estimula HUVEC mediante la incubación con suero SAF o suero control.

### **13.5.2. VARIABLES DEPENDIENTES**

- Moléculas de adhesión: Molécula de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1).
  - Tipo: cuantitativa numérica.
  - Escala: continua.
  - Unidad de Medición: píxeles por área cuadrada en imagen digitalizada de acuerdo a nm de fluorescencia.

- Descripción operativa: se determinó por medio de inmunocitoquímica la fluorescencia de las VCAM-1, ICAM-1.

### **13.5.3. VARIABLES CONFUSORAS:**

- Evento trombótico:
  - Tipo: Cuantitativa numérica.
  - Escala: discreta.
  - Unidad de medición: número evento por paciente.
  - Descripción operativa: se definió como el desarrollo de enfermedad vascular periférica, trombosis venosa ó arterial periférica, cardiopatía isquémica por trombosis de arterias coronarias, enfermedad vascular cerebral, tromboembolia pulmonar ó cualquier estado nuevo de trombosis a cualquier nivel del árbol vascular que se presente durante el seguimiento del estudio, considerando en el caso de las pacientes mujeres el número de abortos.
- Anticuerpos antifosfolípidos:
  - Tipo: cuantitativa numérica.
  - Escala: continua.
  - Unidad de medición: unidades internacionales.
  - Descripción operativa: fueron expresados semicuantitativamente según el Simposio Internacional sobre anticuerpos antifosfolípidos considerando para IgG/IgM como valores positivos bajos (5-15/<6.0), positivos medios (15-80/6-50), ó altos positivos (>80/>50unidades), respectivamente.
- Nivel de anticoagulación.
  - Tipo: cuantitativa numérica.
  - Escala: continua.
  - Unidad de medición: unidades de INR.
  - Descripción operativa: se expresó como el valor numérico de la tasa ajustada internacional de anticoagulación (international normalized ratio, INR).

- Colesterol, Triglicéridos, HDL, LDL:
  - Tipo: cuantitativa numérica.
  - Escala: continua.
  - Unidad de medición: mg/dl.
  - Descripción operativa: definidas por la concentración sérica de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL), y lipoproteínas de baja densidad (LDL) de los pacientes al momento de la toma de las muestras sanguíneas.

## **13.6. DESCRIPCION OPERATIVA GENERAL DEL ESTUDIO**

### **13.6.1. Obtención del Cultivo Primario**

El material biológico para cultivo de células endoteliales se obtuvo de cordones umbilicales de mujeres sanas al momento de parto eutócico, se extrajo con técnicas estériles, se colocó en con solución HANK'S (solución ionicamente balanceada) para quitar los elementos formes de la sangre. Se disecaron los vasos del cordón umbilical y se hizo un corte longitudinal sobre la vena, el tejido por su cara interna el cual fue removido finamente y tratado con una solución de colagenasa tipo IA y tipo IV (2mg/ml) durante 40 minutos. El sobrenadante se utilizó para la el cultivo de células endoteliales. El sobrenadante se colocó en medio de cultivo Dulbecco's Eagle's modificado, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. En dicho medio se obtuvieron capas celulares las cuales se separan y lavan cada una 3 veces a través de centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y resuspensión. Finalmente las células fueron resuspendidas en medio Dulbecco's Eagle's suplementado con suero fetal bovino al 10%, factor de crecimiento endotelial (2ml/100ml de medio) y antibiótico/antimicótico (2ml/100ml de medio), y se sembraron en platillos de cultivo cubiertos con fibronectina en el mismo medio de cultivo pero suplementado con Penicilina(Pen)-Estreptomicina(Strep)-Anfotericina(Anf). Se colocaron en una estufa con ambiente húmedo a 37°C y concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> 5% y O<sub>2</sub> 95%. Las células fueron caracterizadas por su morfología clásica en adoquín y por la expresión del factor de Von Willebran por medio de inmunocitoquímica (22, 23).

### **13.6.2. Mantenimiento de la Línea Celular**

Para mantenimiento de la línea se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's Eagle's suplementado con suero fetal bovino, factor de crecimiento endotelial y Pen-Strep-Anf que se cambió cada 72 hrs. Las células fueron sembradas con una densidad de  $1 \times 10^5$  y se utilizaron para experimento cuando alcanzaron confluencia. Se usaron entre los pasajes 4 y 10, periodo durante el cual mantienen sus características fenotípicas endoteliales.

### **13.6.3. Estimulación Celular**

Antes de realizar el experimento las células se privaron del medio de cultivo de mantenimiento celular, remplazándolo por medio de cultivo que contenía Pen-Strep-Anfo y 0.2% de suero fetal bovino, con la finalidad de sincronizar las células en fase  $G_0$  del ciclo celular. Al momento de iniciar el experimento se desechó por decantación el medio de cultivo, ya que las células poseen adecuada adhesividad al piso de los platillos. Posteriormente se lavaron las células 3 veces con 250  $\mu$ l de solución Krebs-Henseleit con pH de 7.4 a base de HEPES (K-H). Se preincubaron durante 10 min con 250  $\mu$ l de la misma solución anterior a 37°C para estabilizar las células con esta nueva solución. Después se agregaron 250  $\mu$ l de solución K-H en el caso del control, 250  $\mu$ l de suero sano ó suero de paciente SAF. El tiempo de estimulación se evaluó a las 24, 48 y 72 horas ya que la expresión de moléculas de adhesión depende de la síntesis de proteínas que puede requerir de 12 hasta 72 horas para desarrollarse.

### **13.6.4. Inmunocitoquímica.**

Se preparó la cámara de incubación colocando 50  $\mu$ l de albúmina sérica bovina 1.0% por cubreobjeto, por espacio de 30 minutos y en agitación. Se realizaron posteriormente 3 lavados con buffer de fosfatos 0.1M a pH=7.4 con agitación por espacio de 5 minutos. Se colocó el anticuerpo primario a una dilución 1:100, 50  $\mu$ l por cubreobjetos por espacio de 1 hora a temperatura ambiente. Después, se realizaron 3 lavados con buffer de fosfatos 0.1M a pH=7.4 con agitación por



espacio de 10 minutos. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario (fluoresceinado para VCAM-1 y rodaminado para ICAM-1) a una dilución 1:250, 50µl por cubreobjeto, por espacio de 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, después se realizaron nuevamente 3 lavados con buffer de fosfatos 0.1M a pH = 7.4 con agitación por espacio de 10 minutos. Después, se montó el portaobjetos. La albúmina sérica bovina se disolvió con buffer de fosfatos 0.1M a pH=7.4. Posteriormente, en un portaobjetos limpio se puso media gota del protector y conservador de fluorescencia (Vectashield Mounting Medium for Fluorescent with DAPI), se colocaron dos cubreobjetos por portaobjetos y se colocaron los cubreobjetos con las células hacia abajo en contacto con la media gota del protector, se sellaron los cubreobjetos con resina (barniz) y se observaron en el microscopio de fluorescencia. El Vectashield con PI, delimitó los núcleos pero fue necesario tener filtros de 535 nm para excitación y 615 nm de emisión.

#### **13.6.5. Datos clínicos y niveles séricos de anticuerpos antifosfolípidos, lípidos, biometría hemática, química sanguínea, pruebas de coagulación y pruebas de función hepática.**

Los datos clínicos de los pacientes con SAF y de los controles se tomaron por interrogatorio directo y exploración física inmediatamente antes de la toma sanguínea. En todos los casos se revisó el expediente clínico para verificar los valores de laboratorio al momento del diagnóstico.

A los pacientes con SAF se les determinó AL, anticuerpos aCL IgG e IgM, y en caso de ser negativos se les determinó anticuerpos anti  $\beta$ 2GP1. A todos los pacientes se les determinó velocidad de sedimentación, proteína C reactiva, factor reumatoide, anticuerpos antinucleares (ANA), especificidades para anti DNAdc, SSA, SSB, RNP y Sm, así como fracciones del complemento, prueba VDRL (venereal disease research laboratory) C3 y C4 y complemento hemolítico 50%, biometría hemática con diferencial de formula blanca, tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina activada, INR, glucosa, creatinina, ácido úrico, albúmina sérica, transaminasas, bilirruibinas, examen general de orina, depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 horas.

Las determinaciones se llevaron a cabo con equipo Laboratory Instrument -1800 de acuerdo a los estándares de operación y calidad del Laboratorio Central y del Laboratorio de Reumatología de la UMAE La Raza del IMSS así como del Laboratorio de Inmunología del INC.

### 13.7. MÉTODO DE OBSERVACIÓN

Abierto.

### 13.8. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los experimentos de cultivo celular se realizaron por triplicado por cada paciente. Se considero un número arbitrario de 10 pacientes por grupo en forma inicial en este estudio pivote, con reajuste de n de acuerdo a la diferencia de medias. Se determinó la diferencia de medias de la expresión de moléculas de adhesión, con base en su desviación estándar, considerando un poder estadístico del 80% con valor alfa de 0.05 con la siguiente formula (24):

$$n = 2 \left( \frac{(Z\alpha - Z\beta) \sigma}{\mu_1 - \mu_2} \right)^2$$

Valor Z de  $\alpha = 1.96$

Valor Z de  $\beta = -0.84$

Valor  $\sigma = 20.7$  pixeles/área para el caso de VCAM-1 grupo control

$\mu_1 = 136.3$  pixeles/área para grupo SAF

$\mu_2 = 69.3$  pixeles/área paragrupo control

Se consideró la desviación estándar observada de mayor magnitud en pixeles/área. Se sustituyeron los valores de la siguiente forma:

$$n = 2 \left( \frac{(1.96 - (-0.84)) (20.7)}{136.3 - 69.3} \right)^2 = 1.49670822$$

Se calculó por redondeo  $n = 2$  pacientes mínimo por grupo, por lo que se consideraron adecuados los resultados de los ensayos iniciales. Cabe señalar que

los estudios previos en donde se ha utilizado HUVEC estimulado por fracciones IgG de anticuerpos anticardiolipinas y anti  $\beta$ 2GPI se llevaron a cabo con n=6 y n=2 pacientes con SAF respectivamente (25, 26), así como n=10 para el caso del grupo control en el estudio de anticardiolipinas IgG. En este estudio con base en la asignación consecutiva a los grupos se consiguieron 16 pacientes con SAF y 12 controles sanos.

### **13.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos de inmunocitoquímica (píxeles/área) se expresan en promedios  $\pm$  desviación estándar (SD). La comparación entre los grupos de las diferencias de expresión de moléculas de adhesión se realizó con t de Student. Los datos clínicos de los pacientes se expresan como porcentajes para las variables cualitativas nominales y se expresan como promedios  $\pm$  SD para las variables cuantitativas. Se realizó comparación de variables demográficas y somatométricas entre los pacientes con SAF y los controles. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p$  fue menor a 0.05 tanto para los datos de inmunocitoquímica en píxeles/área como para los datos clínicos de los pacientes y controles.

## **14. ASPECTOS ÉTICOS**

Para la obtención del suero humano se requirió de la punción de una vena periférica del paciente. Ello se realizó sólo en caso de ser otorgado el consentimiento informado por escrito del paciente.

El procedimiento riesgoso al cual se expuso el paciente fue la venopunción de vena periférica. Esta maniobra confirió riesgo mínimo al estudio, ya que potencialmente puede haber discreta afectación del retorno venoso en caso de seccionar incidentalmente la vena, o bien hematoma local. Nunca se realizó la venopunción si había datos de diátesis hemorrágica por anticoagulación en caso de que el paciente se encontrara con tratamiento anticoagulante, ni se hacía venopunción si tenía antecedentes de eventos vasculares en dicha extremidad superior.

Durante el estudio no se presentaron eventos relacionados con la venopunción.

Este proyecto fue autorizado por los Comités de Ética de las Instituciones correspondientes.

## 15. RESULTADOS

### 15.1. EFECTO DEL SUERO DE LOS PACIENTES CON SAF PRIMARIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULA DE ADHESION VASCULAR-1

La exposición de las células endoteliales en cultivo monocapa a suero de pacientes con SAF produjo mayor expresión de VCAM-1 en comparación con los niveles basales de su producción cuando sólo fueron estimuladas con suero de paciente sano.

Las células endoteliales se observaron con mayor intensidad cuando fueron estimuladas con suero de pacientes con SAF (figura 2) que cuando fueron estimuladas con suero de individuos sanos (figura 1). Las imágenes digitalizadas mostraron  $69.3 \pm 14.3$  píxeles/área (promedio  $\pm$  desviación estándar) para las células expuestas al suero de individuos sanos y mostraron  $136.3 \pm 20.7$  píxeles/área para las células expuestas al suero de pacientes con SAF (tabla 1). El análisis de los datos mostró diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.001$  entre estos dos grupos (grafica 1).

<b>VCAM-1</b>	<b>Control</b>	<b>SAF</b>
n	12	16
Promedio	69.3	136.3
Desviación estándar	14.3	20.7
Error estándar	3.98	3.7
IC 95%	60.6-78	128.5-144.0
Mínimo-Máximo	47.2-98.8	85.8-174.0

Tabla 1. Efecto del suero control y del suero SAF sobre la expresión de VCAM-1. La comparación entre los grupos se realizó con t de Student,  $p < 0.001$ .

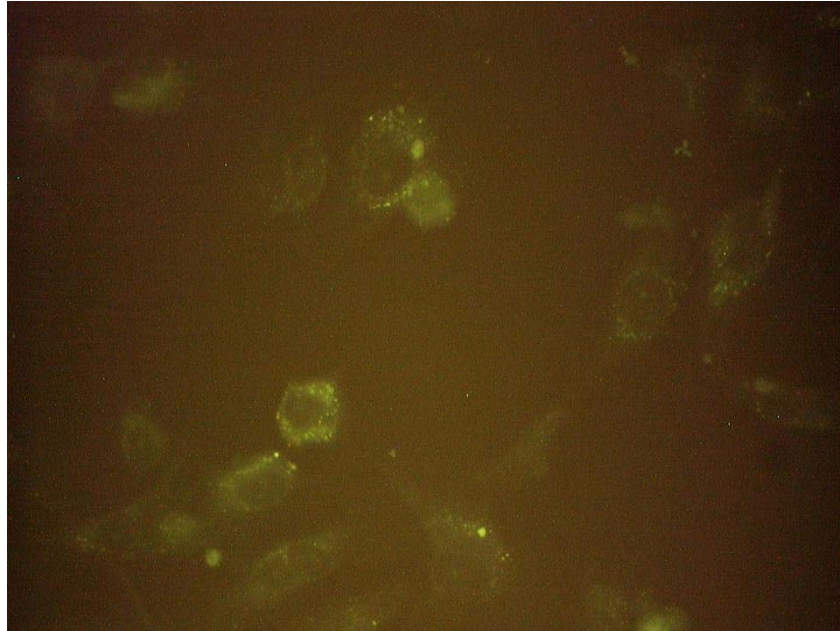


Figura 1. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero control con inmunocitoquímica para VCAM-1.

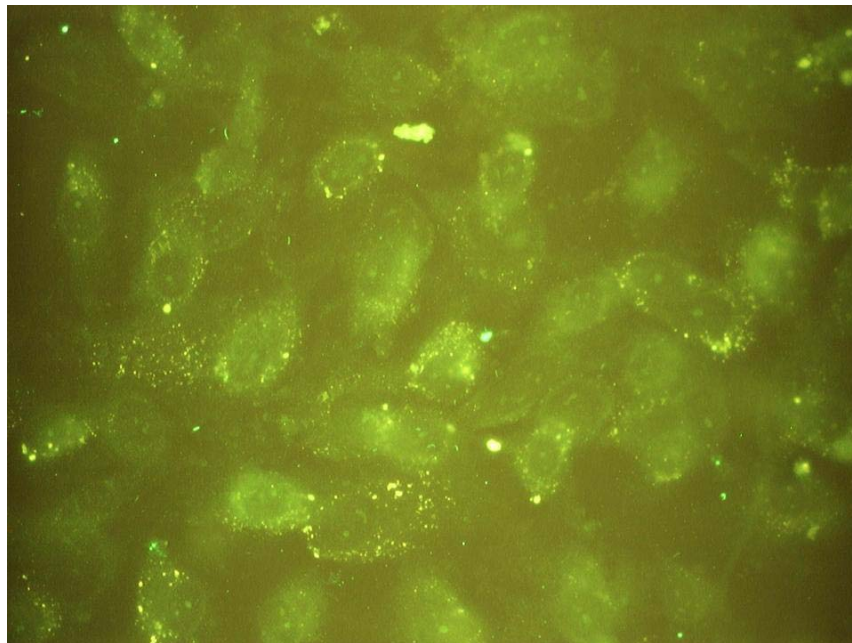
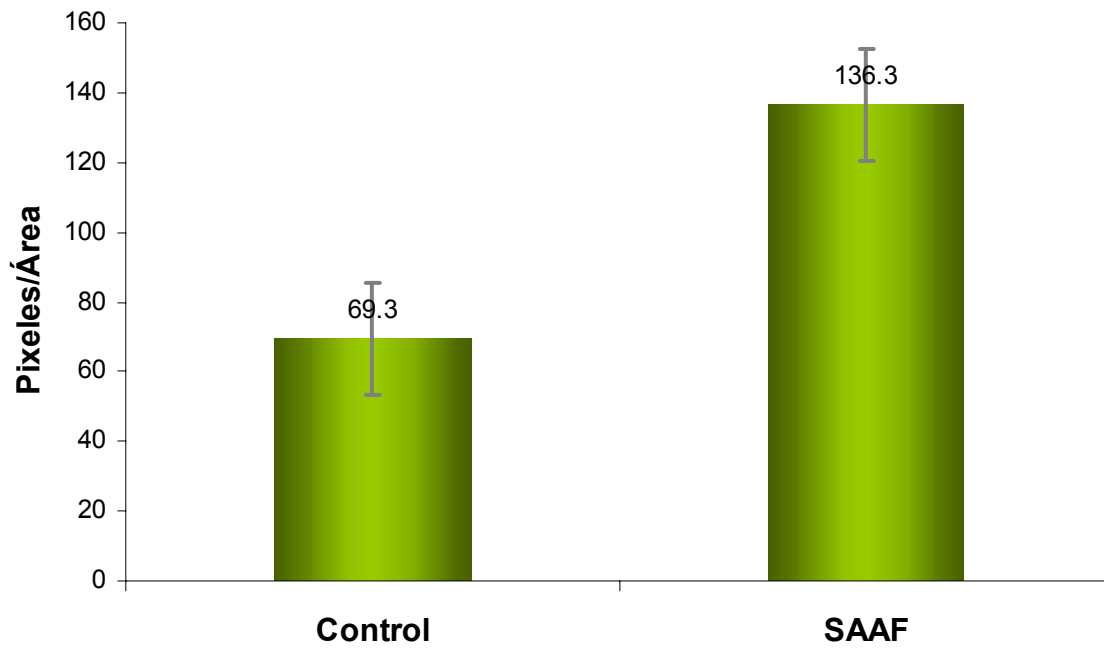


Figura 2. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero SAF con inmunocitoquímica para VCAM-1.

### Expresión de VCAM-1



Gráfica 1. Efecto del suero control y SAF en la expresión de VCAM-1 medida por inmunocitoquímica. Cada barra representa media  $\pm$  error estándar, la comparación entre ambos grupos se realizó con prueba t de Student,  $p < 0.001$ .

## 15.2. EFECTO DEL SUERO DE PACIENTES CON SAF PRIMARIO SOBRE LA EXPRESIÓN MOLÉCULA DE ADHESION INTERCERLULAR-1

La exposición de las células endoteliales en cultivo monocapa a suero de pacientes con SAF produjo mayor expresión de ICAM-1 en comparación con los niveles basales de su producción.

Las células endoteliales se observaron con mayor intensidad cuando fueron estimuladas con suero de pacientes con SAF (figura 4) que cuando fueron estimuladas con suero de individuos sanos (figura 3). Las imágenes digitalizadas mostraron  $88 \pm 12.1$  píxeles/área para las células expuestas al suero de individuos sanos y mostraron  $158.7 \pm 25.2$  píxeles/área para las células expuestas al suero de pacientes con SAF (tabla 2). El análisis preliminar de los datos mostró diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.001$  entre estos dos grupos (grafica 2).

<b>ICAM-1</b>	<b>Control</b>	<b>SAF</b>
n	12	16
Promedio	88.0	158.7
Desviación estándar	12.1	25.2
Error estándar	6.0	10.25
IC 95%	68.7-107.3	100.6-160.2
Mínimo-Máximo	75.5-100.7	75.5-189.0

Tabla 2. Efecto del suero control y del suero SAF sobre la expresión de ICAM-1. La comparación entre los grupos se realizó con t de Student,  $p < 0.001$ .



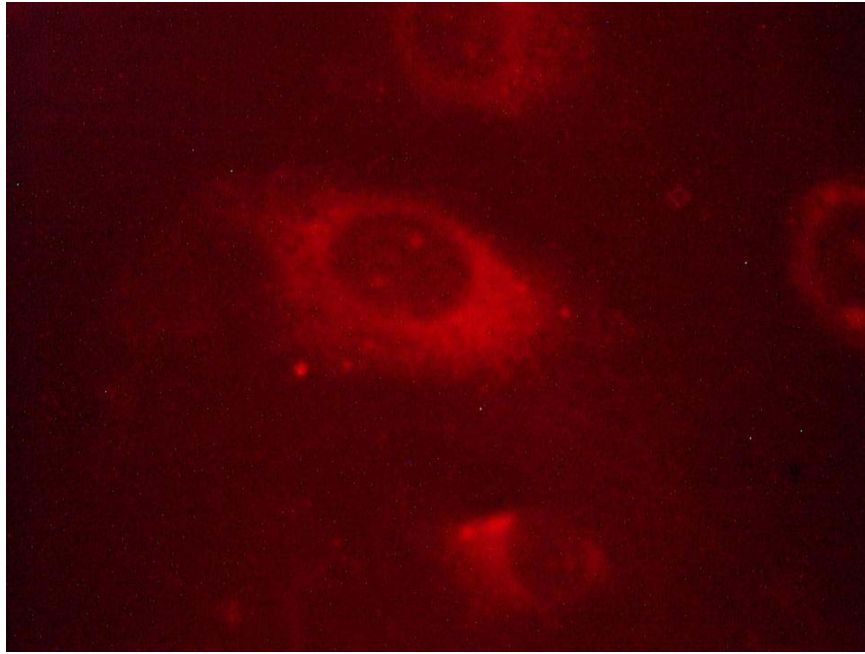


Figura 3. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero control con inmunocitoquímica para ICAM-1.

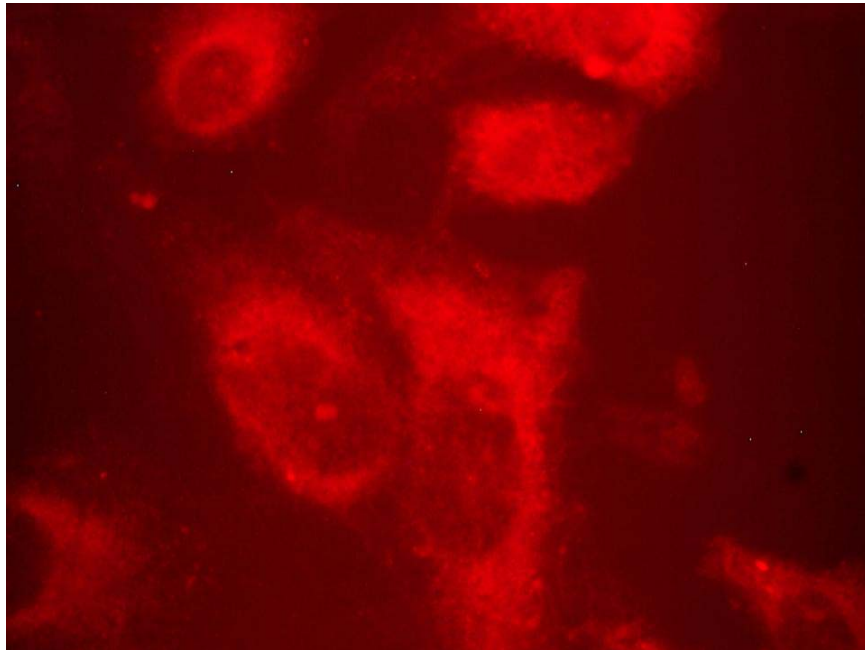
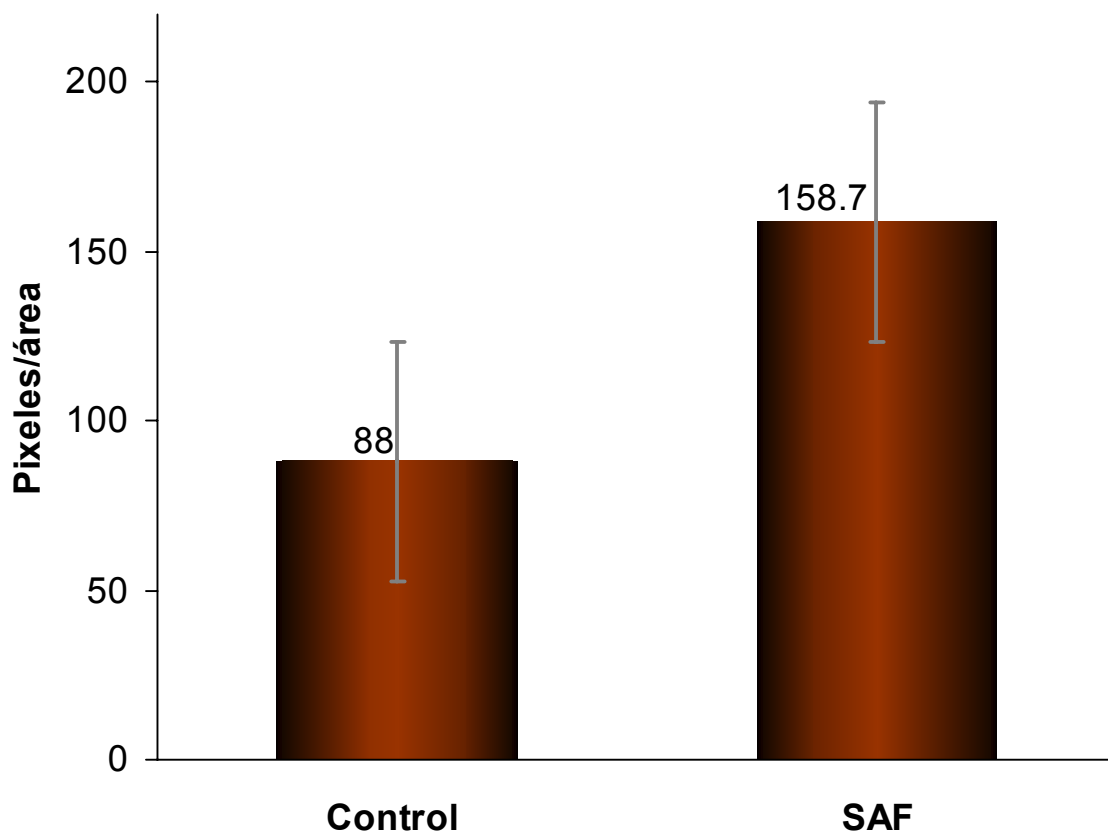


Figura 4. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero SAF con inmunocitoquímica para ICAM-1.

### Expresión de ICAM-1



Gráfica 2. Efecto del suero control y SAF en la expresión de ICAM-1 medida por inmunocitoquímica. Cada barra representa media  $\pm$  error estándar, la comparación entre ambos grupos se realizó con prueba t de Student,  $p < 0.001$ .

### 15.3. DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON SAF Y CONTROLES

Los pacientes con SAF fueron discretamente mayores de edad en relación a los pacientes control con alrededor de una década de diferencia de edad. El grupo de controles presento un mayor porcentaje de pacientes de sexo masculino en relación al grupo SAF. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los controles y los pacientes con SAF respecto a peso, talla, índice de masa corporal, cintura, cadera, índice cintura cadera (tabla 3).

VARIABLE	SAF				CONTROLES				valor p
	n=16	Porcentaje	Promedio	SD	n=12	Porcentaje	Promedio	SD	
Sexo femenino	13	81.30%			8	66.70%			0.39
Sexo masculino	3	18.80%			4	33.30%			0.39
Edad			47.81	12.35			38.08	6.8	0.02
Peso			71.83	13.03			75.62	12.76	0.47
Talla			160.07	10.59			163.08	7.39	0.42
IMC			32.98	11.22			35.68	10.92	0.55
Cintura			90.5	7.72			92.5	8.54	0.68
Cadera			99.5	10.08			103.25	5.31	0.34
Indice Cintura/Cadera			0.91	0.05			0.89	0.57	0.6

Tabla 3. Datos demográficos y somatométricos de los pacientes con SAF y los controles. SD, desviación estándar.

Los pacientes con SAF tenían alrededor de 10 años de diagnóstico y presentaron en promedio 3 eventos vasculares trombóticos de los cuales predominaron los eventos arteriales en relación a los venosos 2:1 aproximadamente. Con respecto a los antecedentes gineco-obstétricos, la misma cantidad de número de gestaciones apenas sobrepasa el promedio del número de abortos, y las pérdidas fetales ocurrieron alrededor de la 16<sup>a</sup> semana de gestación.

De las manifestaciones clínicas asociadas a SAF sólo los síntomas neurológicos, valvulopatías y HAP moderada fueron más frecuentes. Los síntomas neurológicos reportados en la mayoría de los pacientes fueron cefalea migrañosa (5/16), seguida de hemiparesia como secuela de EVC (2/16), y amaurosis fugax por

neuritis óptica retrobulbar (1/16). Las principales valvulopatías encontradas fueron doble lesión mitral (2/16), insuficiencia mitral (2/16) ó insuficiencia tricuspídea (5/16) e insuficiencia aórtica (1/16), sólo un paciente tenía comunicación interauricular del tipo ostium secundum. El 25% de los pacientes con SAF no tenía ninguna enfermedad concomitante, el resto cursaba con por lo menos una enfermedad concomitante como hipertensión arterial sistémica (6/16), diabetes mellitus (2/16), obesidad mórbida (1/16), hipotiroidismo (3/16) depresión (3/16), neuropatía crónica obstructiva (3/16), aterosclerosis carotídea (2/16), hipertrigliceridemia (2/16), hipoplasia renal derecha (1/16), laberintopatía vascular (1/16), purpura trombocitopénica (1/16), síndrome quiasmático por adenoma hipofisiario (1/16), fibromialgia (2/16), cardiopatía reumática inactiva (1/16) y púrpura trombocitopénica (1/16). Al momento de la toma sanguínea todos los pacientes se encontraban en control de sus enfermedades concomitantes (gráfica 3). Ningún paciente con SAF presentó corea, úlceras en la extremidades ni SAF catastrófico (tabla 4).

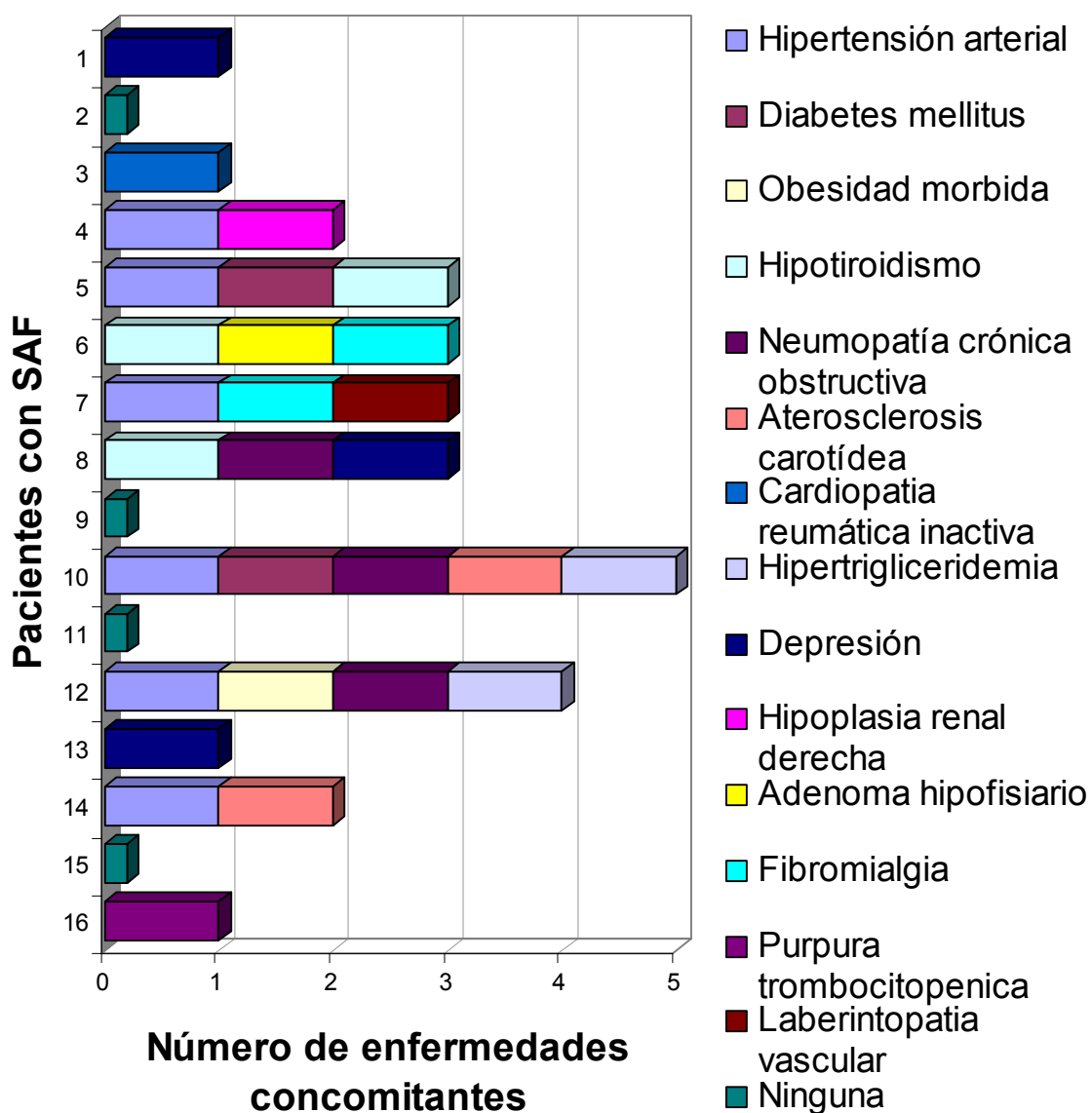
El 93.8% se encontraba anticoagulado con acenocumarina, sólo una paciente con manifestaciones puramente obstétricas se encontraba en vigilancia con tratamiento a base de aspirina, el resto de los pacientes anticoagulados tenían INR de  $2,74 \pm 0.56$ . Las muestras sanguíneas se tomaron antes de la dosis siguiente de sus tratamientos médicos (gráfica 4). A los pacientes con depresión se les había suspendido por remisión su tratamiento antidepresivo al momento de tomar la muestra sanguínea. Además, uno de los pacientes con neumopatía crónica obstructiva utilizaba fluticasona inhalada y el paciente con púrpura trombocitopénica había utilizado esteroides vía oral y azatioprina, estos tratamientos se habían suspendido varias semanas antes por mejoría.

VARIABLE	SAF			
	n =16	Porcentaje	Promedio	SD
Eventos vasculares totales			3.07	1.94
Eventos vasculares arteriales			2.36	1.68
Eventos vasculares venosos			1.54	1
Gestaciones			2.6	1.22
Abortos			2.2	1.09
Semanas de gestación de producto			16	4.8
Preeclampsia			1.25	0.5
Años de diagnóstico			10.4	3.7
Livedo	3	18.80%		
Valvulopatía	6	37.50%		
Otras cardiopatías	1	6.30%		
Hipertensión arterial pulmonar	6	37.50%		
Presión sistólica de la arteria pulmonar			45.83	12.82
Síntomas neurológicos	7	43.80%		
Corea	0	0%		
Úlceras en extremidades	0	0%		
SAF catastrófico	0	0%		
Anticardiolipina IgG	15	93.80%		
Anticardiolipina IgM	3	18.80%		
Anticoagulante lúcido	1	6.30%		
Anti $\beta$ 2GPI	1	6.30%		
VDRL falso positivo	4	25%		
ANA positivos	3	18.80%		
C3			113.96	20.44
C4			16.82	5.11
Complemento hemolítico 50%			160	113
Velocidad de sedimentación globular			19.8	12.57
Proteína C reactiva			0.42	0.32
INR			2.74	0.56
Tiempo de protrombina			29.7	10.9
Tiempo parcial de tromboplastina activada			65.58	33.4
Colesterol total			196	39.64
Colesterol HDL			43.2	6.61
Colesterol LDL			130.4	32.5
Triglicéridos			178.85	83.88
Hemoglobina			14.98	1.48
Hematocrito			43.37	4.62
Leucocitos			6439	1759
Linfocitos			1809	440
Neutrófilos			3866	1171
Monocitos			378	56
Eosinófilos			211	108
Basófilos			5.7	1.4
Bandas y formas inmaduras			0	0

Plaquetas		226000	91138
Glucosa		93	31
Creatinina		0.82	0.22
Ácido úrico		5.54	1.8
Depuración de creatinina		87.77	25.52
Proteinuria		182.2	8.6
Albúmina sérica		4.16	0.4
Transaminasa glutámico oxalacética		22.12	3.9
Transaminasa glutámico pirúvica		22.61	11.9
Bilirrubina total		0.45	0.09
Bilirrubina directa		0.15	0.02
Bilirrubina indirecta		0.29	0.09
Deshidrogenada láctica		221	164
Examen general de orina normal	16	100%	

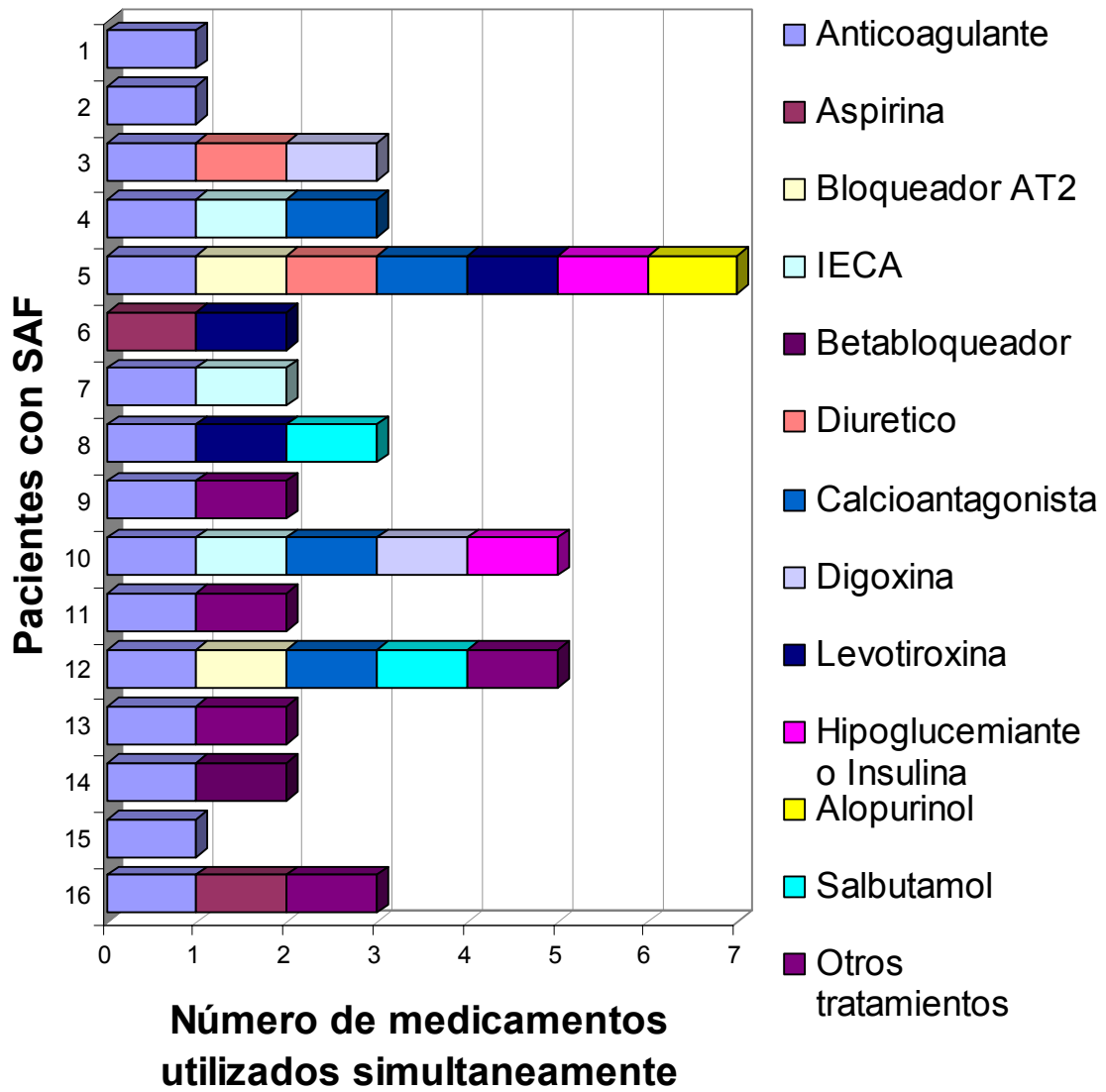
Tabla 4. Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con SAF. Los datos se expresan como n y porcentaje para las variables cualitativas nominales y se expresan en promedio  $\pm$  desviación estándar (SD) para las variables cuantitativas.

## COMORBILIDAD EN SAF



Gráfica 3. Comorbilidad de los pacientes con SAF.

## TRATAMIENTO MÉDICO EN GRUPO SAF



Gráfica 4. Tratamiento médico en los pacientes con SAF.



## **16. DISCUSIÓN**

Los mecanismos patogénicos propuestos de los anticuerpos antifosfolípidos se basan en el hecho de la activación endotelial que favorece un fenotipo protrombótico y de aterosclerosis acelerada.

Nuestros resultados corroboran el hecho de que los anticuerpos antifosfolípidos tienden a aumentar la expresión de moléculas de adhesión como uno de sus mecanismos patogénicos, así como estudios previos *in vivo* e *in vitro* (20, 21, 25, 26).

Así, el endotelio se encuentra activado persistentemente en los pacientes con SAF, sin traducir estrictamente un proceso inflamatorio agudo como en el caso de las vasculitis con infiltrado inflamatorio, pero sí favoreciendo aterosclerosis y trombosis mediante la perpetuación de un fenotipo trombótico y activación endotelial. Este conocimiento nos permite comprender más porque los pacientes con SAF y probablemente otras enfermedades inmunológicas tienen procesos de aterosclerosis acelerada (11), y por ello los factores de riesgo cardiovascular tradicionales de Framingham no alcanzan a estimar adecuadamente el riesgo de eventos cardiovasculares en estos pacientes.

Actualmente el tratamiento médico del SAF se encuentra sólo enfocado al estado protrombótico de esta enfermedad. Sin embargo, no debemos dejar de considerar la evidencia actual acerca de los procesos de aterosclerosis acelerada que estos pacientes tienen, tomando en cuenta también que en sí misma la aterosclerosis puede ser un proceso altamente relacionado con otros procesos inflamatorios (11,13).

Por ello es importante determinar inicialmente en modelos *in vitro* si algunas alternativas de tratamiento farmacológico pueden ofrecer otros beneficios al tratamiento actual de los pacientes con SAF. Sobre todo ya que actualmente sólo se les maneja en general con anticoagulantes orales y esto tiene un alto riesgo de hemorragias (9). Así, basados en el hecho de que los anticuerpos antifosfolípidos pueden activar a la célula endotelial proponemos este modelo *in vitro*, simple, en el cual se pueden ensayar de manera inicial el tratamiento farmacológico del SAF.

La principal ventaja operativa de este modelo sencillo es que no necesita de la purificación de los anticuerpos antifosfolípidos del suero de los pacientes, ya que se utiliza suero total, tanto de los pacientes como de los sujetos control. Es importante recalcar que en este trabajo además de confirmar conocimientos previos respecto a los mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolípidos, el principal objetivo es ver si realmente hay activación endotelial por el mismo suero total de los pacientes, sin ninguna extracción de sus componentes, y de esta manera proponer un modelo simple para evaluar otras alternativas de tratamiento farmacológico.

Otra ventaja es la naturaleza misma de ser un modelo in vitro ya que no hay riesgos a los cuales se expongan los pacientes salvo la punción venosa, que en este estudio no se presentó ninguna complicación.

Otra de las ventajas es que se puede predecir con una base racional el uso de ciertos fármacos. Para ilustrar este rubro, hay que considerar por ejemplo que no todos los medicamentos son iguales, aunque pertenezcan a un mismo grupo de fármacos. Actualmente las estatinas son un grupo de medicamentos inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A, enzima limitante de la síntesis de colesterol. Recientemente se ha encontrado evidencia de que las estatinas poseen varios efectos pleiotrópicos, los cuales podrían ser benéficos en el tratamiento de los pacientes con SAF (27). Sin embargo, se ha encontrado incluso que un mismo medicamento a la misma concentración en el mismo modelo in vitro tuvo efectos contrarios en la expresión de moléculas de adhesión; se encontró que la fluvastatina 5 $\mu$ M disminuye la expresión de E-selectina e ICAM-1 en HUVEC estimulado por fracciones IgG de pacientes con anticuerpos anti- $\beta$ 2GPI (26), y por el contrario aumenta la expresión de VCAM-1, E-selectina, factor tisular y proteína quimioattractante de monocitos -1 cuando HUVEC es estimulado con fracciones IgG de pacientes con anticuerpos anticardiolipinas y anti  $\beta$ 2GPI (25). Es por esto, que se debe tener en cuenta una forma inicial de ensayo farmacológico en SAF sin asumir que el comportamiento será similar en todos los casos, ya que por sí mismo el contexto clínico del SAF es sumamente amplio. En este modelo tratamos de minimizar el efecto de las múltiples variables clínicas que se pueden atribuir a

los procesos de los pacientes con SAF secundario por lo que sólo se consideraron pacientes con SAF primario.

Por otro lado el hecho de utilizar material biológico humano para su realización, disminuye los errores de inferencias a partir de modelos animales.

Además desde el punto de vista de costos tiene la ventaja de utilizar una evaluación mediante imágenes digitalizadas que desde el punto de vista económico es menos costoso que otras técnicas cuantitativas biomoleculares.

No obstante, las mismas ventajas de este modelo también le confieren per se sus limitantes. Los modelos in vitro no evalúan en un sentido integral la respuesta de un ser vivo total aunque se intentó minimizar con el uso del suero total. También hay que considerar que la evaluación mediante pixeles por área es una medición semicuantitativa y se requieren técnicas como Western blot y/o reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR) para confirmar la expresión cuantitativa de moléculas de adhesión.

A pesar de las limitantes que puede tener este modelo consideramos que es de gran utilidad para estudiar otras alternativas de tratamiento en los pacientes con SAF.

Por el momento, aún se encuentra pendiente la fase de experimentación con algunos fármacos pero el establecer los valores iniciales de expresión de moléculas de adhesión es importante plataforma para continuar el estudio del papel de esos medicamentos en el tratamiento del SAF.

Una de las limitantes más importante de este modelo es la gran variabilidad de las manifestaciones clínicas de los pacientes, los cuales tienen por lo menos diferencias significativas respecto a la edad y la distribución de los pacientes por sexo. Recientemente se ha corroborado que el sexo de los pacientes con SAF primario puede tener algunas diferencias clínicas (28) por lo que será conveniente igualar la distribución por sexo en futuras investigaciones. Otra de las limitantes de este modelo está también relacionada con el amplio espectro de manifestaciones clínicas que los pacientes tiene en relación a los sujetos control, ya que estos últimos son donadores sanos de acuerdo a la norma oficial mexicana para donación de sangre segura (29) que excluye algunas enfermedades

concomitantes en los pacientes con SAF. Cabe mencionar que al diseño de este estudio escapa el objetivo de correlación con variables clínicas de los pacientes con SAF ya que se trata de un modelo in vitro como exploración inicial de fármacos con potencias beneficio en esta enfermedad. No obstante esta última limitante también aporta una ventaja, ya que en la realidad de la práctica clínica reumatológica, los pacientes con SAF se presentan de esa forma, con una gran gama de manifestaciones. Por ello se amplió la muestra de los pacientes con SAF de tal manera que por lo menos la mayoría de las manifestaciones se tuvieran en el grupo de SAF en dos ocasiones de acuerdo al número de muestra calculado para la expresión de moléculas de adhesión en pixeles/área.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de este modelo in vitro de SAF.

Ventaja	Desventaja
No requiere de la purificación de anticuerpos	No todos los pacientes tienen el mismo contexto clínico
Modelo in vitro que no confiere ningún riesgo a los pacientes salvo la venopunción	
Utiliza productos biológicos humanos completamente. Por ello más válido que los modelos in vivo animales.	Es evento in vitro, sólo se puede suponer una aproximación a lo que puede suceder en el ser humano sin el efecto holístico del organismo completo.
La medición de pixeles/área es simple y económica en relación a técnicas cuantitativas.	La mediación de pixeles en una técnica semicuatitativa sin que se haya valorado en este modelo su correlación con técnicas cuantitativas.

## **17. CONCLUSIONES**

El suero de pacientes con SAF primario aumenta la expresión de moléculas de adhesión tanto VCAM-1 como ICAM-1 en endotelio vascular de cordón umbilical en cultivo monocapa.

Proponemos un modelo simple con el suero de pacientes con SAF primario y HUVEC in vitro en el cual se puede corroborar de manera semicuantitativa la expresión de moléculas de adhesión.

Este modelo in vitro permitirá explorar el impacto de varias modalidades de tratamiento sobre la expresión de moléculas de adhesión involucradas en la activación endotelial.

## **18. GLOSARIO**

aCL	Anticuerpos anticardiolipina
AL	Anticoagulante lúdico
Anf	Anfotericina
aPL	Anticuerpos antifosfolípidos
β2GPI	Beta 2 glicoproteína I
ELISA	Ensayo enzimático estandarizado inmunoabsorbente
ESM	Escuela Superior de Medicina
HANK'S	Solución de Hank
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular -1
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IMSS	Instituto Nacional del Seguro Social
INC	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
INR	Internacional Index Ratio
IPN	Instituto Politécnico Nacional
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Pen	Penicilina
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa reversa
SAF	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos
SD	Desviación estándar
Strep	Estreptomicina
UMAЕ	Unidad Médica de Alta Especialidad
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular -1

## 19. BIBLIOGRAFIA

1. Durrani O, Gordon C and Murray P. **Primary antiphospholipid syndrome (APS): current concepts.** Surv Ophthalmol 2002;47(3):215-38.
2. Ogunyemi D, Cuellar F, Wayne K, et al. **Association between inherited thrombophilias, antiphospholipid antibodies, and lipoprotein a levels and venous thromboembolisms in pregnancy.** Am J of Perinatology 2003;20(1):17-23.
3. Bulckaen H, Puiseux F, Bulckaen E, et al. **Antiphospholipid antibodies and the risk of thromboembolic events in vascular heart disease.** Mayo Clinic Proc 2003;78:294-8.
4. Wilson W, Gharavi A, Koike T, et al. **International consensus statement on the preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome.** Arthritis and Rheumatism 1999; 42(7):1309-11.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T et al. **International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS).** J Thromb Haemost 2006;4:295-306.
6. Nahass G. **Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid antibody syndrome.** J Am Acad Dermatol 1997;36(2):149-68.
7. Asherson RA, Cervera R. **Catastrophic antiphospholipid syndrome.** Curr Rheumatol Rep 2003;5(5):395-400.
8. Crowther M, Ginsberg J, Julian J, et al. **A comparison of two intensities of warfarin for prevention of recurrent thrombosis in the patients with the antiphospholipid syndrome.** N Engl J Med 2003;349:1133-38.
9. Lockshin M and Erkan D. **Treatment of the antiphospholipid syndrome.** N Engl J Med 2003;349:1177-9.
10. Gharavi AE, Wilson W and Pierangeli S. **The molecular basis of the antiphospholipid syndrome.** Lupus 2003;12:579-83.
11. Jara L, Medina G, Vera-Lastra O, and Shoenfeld Y. **Atherosclerosis and antiphospholipid syndrome.** Clinical Reviews in Allergy and Immunology 2003;25:79-87.

12. Sáenz E. **Moléculas de adhesión celular**. Revista de Medicina Interna Concepción 1997; 1(1):6-4.
13. Libby P, Ridker P, Meseri A. **Inflamation and atherosclerosis**. Circulation 2002;105:1035-1143.
14. Davies P and Tripathi S. **Mechanical stress mechanism and the cell: and endothelial paradigm**. Circulation Research 1993;72:239-45.
15. Sherer Y and Shoenfeld Y. **Inmunomodulation for the treatment and prevention of atherosclerosis**. Autoimmunity Reviews 2002;1:21-7.
16. Medina G, Casaos D, Jara L, et al. **Increases carotid artery intima-media thickness may be associated with stroke in primary antiphospholipid syndrome**. Ann Rheum Dis 2003;62:607-10.
17. Shoji T, Fukomoto M, Kimoto E, et al. **Antibody to oxidized low-density lipoprotein and the cardiovascular mortality in the end stage renal disease**. Kidney International 2002;62:2230-7.
18. Horkko S, Olee T, Mo L, et al. **Anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid antibody syndrome recognize epitopes in both  $\beta_2$ -glycoprotein 1 and oxidized low-density lipoprotein**. Circulation 2001;103:941-50.
19. Meroni PL, Raschi E, Tesloni C, et al. **Antiphospholipid antibodies and the endothelium**. Rheumatic Disease Clinics 2001;27(3):587-61.
20. Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, et al. **GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activated endothelial cell in vivo and in vitro**. J Immunol 1999;163:2922-7.
21. Gharavi EA, Pierangeli SS, Espindola RG, et al. **Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo**. Arthritis and Rheum 2002;46:545-52.
22. Rivero-Vilches F, De Frutos S, Saura M, et al. **Differential relaxing responses to particulate or soluble guanylyl cyclase activation on endothelial cell: a mechanism dependent on pKG-  $\alpha$  activation by NO/cGMP**. Am L Physiol Cell Physiol 2003;285:C891-8.



23. González-Santiago L, López-Ongil S, Rodríguez-Puyol M and Rodríguez Puyol D. **Decreased nitric oxide synthesis in the endothelial cell cultured on the type I collagen.** *Circ Res* 2002;90:539-45.
24. Dawson Beth and Trapo Robert G. **Bioestadística médica.** 3a edición. El manual moderno, México, 2002. 170-171 p.p.
25. Duyoner-Greinde S, Dimitrova Y, Satta N y cols. **Fluvastatin increase the expression of adhesion molecules, monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in HUVEC stimulated by patient IgG fractions containing antiphospholipid antibodies.** *Thromb Haemost* 2005;93(2):339-45.
26. Meroni P, Rasachi E, Testoni C, et al. **Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti- $\beta$ 2-glycoprotein I) antibodies.** *Arthritis Rheum* 2001;44(12):2870-2878.
27. Erkan D, Lockshin M. **New treatments for antiphospholipid syndrome.** *Rheum Dis Clin N Am* 2006;32:129-148.
28. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Barile L. **The impact of gender on clinical manifestations of primary antiphospholipid syndrome.** *Lupus* 2005;14(8):607-12.
29. **Norma Oficial Mexicana NOM 003-SSA2-1993 Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.** Diario oficial de la federación 18 de Julio de 1994.