



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

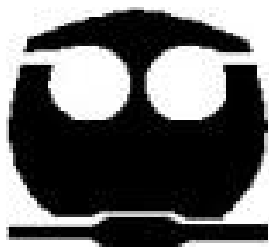
**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN
(INCMNSZ)**

**PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-ANEXINA
V EN PACIENTES CON SINDROME DE
ANTIFOSFOLIPIDOS PRIMARIO Y/O ASOCIADO A
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA**

**P R E S E N T A :
Q.C. OSIRIS AVILA GALICIA**



ASESOR DE TESIS: DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS

MEXICO D.F.

Junio 2007



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Julio Granados Arriola
Vocal	M. en C. Rodolfo Pastelín Palacios
Secretario	E.B.C. Lina Romero Guzmán
Primer Suplente	Dr. José Pérez Jáuregui
Segundo Suplente	Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas

Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Laboratorio de Inmunología y Reumatología, Área de Inmunología Humoral.

Asesor del Tema:

Dr. Javier Cabiedes Contreras

Sustentante:

Q.C. Osiris Ávila Galicia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Dr. Javier Cabiedes Contreras por haber dirigido este trabajo y por el apoyo que siempre me ha brindado.

A la Dra. Lirio por su colaboración en este proyecto.

A la Q.B.P. Teresita , Q.B.P. Araceli Martínez Castillo, Q.C. Carlos Núñez, Q.F.B. Adriana, que me apoyaron incondicionalmente para llevar a cabo todo el trabajo técnico.

Quiero agradecer también al Dr. Antonio R. Villa R. Jefe de la unidad epidemiológica por su apoyo para la realización del estudio estadístico.

Al Dr. Julio Granados Arriola, al M. en C. Rodolfo Pastelín Palacios, Esp. B.C. Lina Romero Guzmán, Dr. José Pérez Jáuregui y a la Dra. Ana Esther Cárdenas, quienes amablemente accedieron a revisar esta tesis y contribuyeron significativamente a su enriquecimiento.

DEDICATORIAS

A mi mami Yolanda a quien le debo lo que soy

A mi padre Andrés que por mucho tiempo no entendí

A mis hermanos Andrés y Omar[†]

Sobre todo a Omar[†] , que siempre me apoyo y confió en mi para llevar a cabo este proyecto.

A Martiniano por su amor, apoyo, confianza y porras para no rajarme.

Al Dr. Javier Cabiedes Contreras mi mentor

A la Universidad Veracruzana y a la UNAM por haberme formado.

A Teresita, Araceli, Carlos, por su amistad tan valiosa, por las buenas pláticas y consejos brindados.

A Chayito y Dari por las buenas pláticas sin censuras, a Israel y Araceli Lucina, por los momentos tan divertidos que pasamos juntos, a Moni y Margarita por las buenas pláticas y amistad brindada.

También quiero agradecer a todos aquellos que se interesaron en algún momento en mi trabajo y me brindaron el placer de ser escuchada.

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
II. GENERALIDADES.....	3
2.1 Antecedentes históricos.....	3
2.2 Fisiopatología de los fosfolípidos.....	4
2.3 Anticuerpos anti-fosfolípidos.....	6
2.4 Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SaF).....	7
2.5 Anexina V.....	10
III. JUSTIFICACION.....	12
IV. OBJETIVOS.....	13
V. PACIENTES Y METODOS.....	14
5.1 Pacientes y controles.....	14
5.2 Métodos.....	15
5.3 Manejo y almacenamiento.....	15
5.4 Protocolo del equipo DSX.....	15
5.5 Control de calidad.....	16
5.6 Método de cálculo.....	16
5.7 Cuantificación de anticuerpos anti-anexina V	16
5.8 Cuantificación de anticuerpos anti- cardiolipina	17
5.9 Cuantificación de anticuerpos anti-protrombina.....	18
5.10 Cuantificación de anticuerpos anti- β_2 GP-I	19
5.11 Cuantificación de anticuerpos anti-cardiolipina libre de fosfolípidos.....	20
5.12 Cuantificación de anticuerpos anti-ácido fosfatídico.....	22

5.13 Cuantificación de anticuerpos anti-fosfatidilinositol.....	23
5.14 Cuantificación de anticuerpos anti-fosfatidilserina.....	24
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
VII. RESULTADOS.....	26
7.1 Características demográficas y clínicas de los sujetos estudiados ..	26
7.1.1 Sujetos sanos.....	26
7.1.2 Pacientes con SaF primario.....	26
7.1.3 Pacientes con SaF secundario.....	26
7.1.4 Curvas de distribución de los anticuerpos cuantificados en la población sana y en pacientes con SaFP y SaFS.....	28
7.1.5 Valores de referencia de los anticuerpos e isotipos estudiados en la población normal.....	38
7.1.6 Prevalencia de anticuerpos aFL/cofactores en pacientes con SaF.....	40
7.1.7 Prevalencia de anticuerpos aFL/cofactores en pacientes con SaFP y SaFS.....	43
7.1.8 Manifestaciones clínicas en pacientes con SaFP y SaFS.....	44
7.1.9 Correlación entre anticuerpos aFL/cofactores y manifestaciones clínicas en pacientes con SaF.....	46
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	55

RESUMEN

El síndrome de anti-fosfolípidos (SaF) es una enfermedad autoinmune mediada por autoanticuerpos. Este síndrome puede presentarse como entidad única, en cuyo caso se denomina SaF primario (SaFP), o asociado a otras enfermedades autoinmunes, especialmente Lupus Eritematoso Generalizado (LEG), en cuyo caso se conoce como SaF secundario (SaFS). Se han propuesto dos mecanismos fisiopatológicos para los aFL patogénicos, los cuales son: a) En el que los aFL pueden alterar las reacciones hemostáticas que se llevan a cabo en la superficie celular; b) Los aFL pueden estimular a ciertas células para que expresen y liberen diversas moléculas. En la actualidad ha aumentado el interés por el estudio del SaF, debido a que se ha documentado una fuerte correlación entre la presencia de dichos anticuerpos con manifestaciones clínicas tales como: trombosis, trombocitopenia y pérdidas fetales recurrentes. En publicaciones recientes se ha documentado la importancia de la anexina V en el desarrollo del SaF. Uno de los mecanismos patogénicos de los anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL) propuesto, es aquel en que la anexina V es desplazada de las membranas fosfolípídicas del endotelio vascular disminuyendo la capacidad anticoagulante de éstas y aumentando su capacidad procoagulante.

En el presente trabajo estudiamos 85 sujetos sanos de los cuales, 52 son mujeres con promedio de edad de 35.4 ± 10.9 años, 33 hombres con promedio de edad 35.4 ± 10.6 años y 31 pacientes con SaF, de los cuales 17 tienen SaFP (14 mujeres) con promedio de edad de 39.7 ± 10.5 años, 13 pacientes con SaF asociado a LEG (10

mujeres) y un paciente con SaF y síndrome de Sjögren. El promedio de edad del grupo de pacientes con SaFS fue de 36.1 ± 11.3 años.

Se determinó la concentración de los siguientes anticuerpos: aAN-V, a β_2 GP-I, aCL/ β_2 GP-I, aCL, aPt, aAF, aFTS y aFTI isotipos IgG e IgM mediante ELISA. Se establecieron los valores de referencia de los anticuerpos: aAN-V IgG ≤ 5.6 U/mL, IgM ≤ 4.8 U/mL; aCL IgG ≤ 11.5 GPL U/mL, IgM ≤ 4.4 MPL U/mL; IgA ≤ 4.34 APL U/mL; aPT IgG ≤ 11.5 U/mL, IgM ≤ 8.1 U/mL; a β_2 GP-I IgG 2.5 U/mL, IgM 3.4 U/mL; IgA 6.3 U/mL; CL/ β_2 GP-I IgG ≤ 1.9 UA; IgM ≤ 2.6 UA; aAF IgG < 3.9 GPL U/mL; aFTI IgG < 3.2 GPL U/mL; y aFTS IgG < 4.94 GPL U/mL.

Se evaluó clínica y serológicamente la actividad del SaFP y SaFS. La prevalencia de anticuerpos positivos observada en los pacientes fue: 90.3% (n=28) aCL/a β_2 GP-I IgM y 80.6% (n=25) aFTI IgG; aAF IgG, 64.5% (n=20) para a β_2 GP-I IgG; 61.3% (n=19) para aCL/ a β_2 GP-I IgA y para aFTS IgG; los anticuerpos de menor prevalencia fueron los aAN-V IgG, 22.5% (n=7). El porcentaje de pacientes con títulos positivos de aFL/cofactores entre SaFP y SaFS no fue significativamente diferente. Las manifestaciones que se asociaron a la presencia de los anticuerpos fueron: evento vascular cerebral 58.8% (n=10) SaFP vs 14.3% (n=2) SaFS, (p=0.024) y linfopenia con 29% (n=5) SaFP vs 71.4% (n=10) SaFS, (p=0.032). De los anticuerpos aFL/cofactores, las manifestaciones clínicas y las características del laboratorio que mostraron mayor prevalencia en el presente estudio fueron: aCL/a β_2 GP-I IgM y aFTI IgG (28/31), aAF IgG (25/31), a β_2 GP-I IgG (20/31), aCL/ a β_2 GP-I IgA y aFTS IgG (19/31), linfopenia (15/31), trombocitopenia (14/31), trombosis venosa profunda

(13/31), evento vascular cerebral, abortos (12/31) y migraña (10/31). En conclusión los valores de referencia establecidos en la población estudiada, ayudarán a que en el Servicio de Inmunología y Reumatología del INNSZ, se detecten, sigan y traten a los pacientes con SaF en función de pruebas de laboratorio más sensibles y confiables. La prevalencia de los aAN-V es muy baja en los pacientes con SAFP y/o asociado a LEG estudiados, sin embargo la presencia de títulos altos de estos anticuerpos se asociaron a manifestaciones como amaurosis fugax y crisis convulsiva; títulos altos de α_2 GP-I IgM se asociaron con trombosis venosa superficial, microangiopatía trombótica y fenómeno de Raynaud; los aCL de isotipo IgG se asociaron con trombocitopenia y los aCL IgM con Corea en pacientes con SaFP; aFTS IgG se asociaron con abortos, aAF IgG con linfopenia y aFTI IgG con anemia hemolítica.

Esto demuestra que en nuestra población de pacientes con SaFP existe un mayor riesgo de sufrir evento vascular cerebral, trombocitopenia, abortos y migraña; mientras que el grupo de SaFS tienen un mayor riesgo para desarrollar trombosis venosa profunda, linfopenia y trombocitopenia.

ABREVIATURAS

AF	Acido fosfatídico
AL	Anticoagulante lúpico
Ac	Anticuerpo
aCL	Anticuerpos anti-cardiolipina
aFL	Anticuerpos anti-fosfolípidos
Ag	Antígeno
aAN-V	Anticuerpos anti-anexina V
a β_2 GP-I	Anticuerpos anti- β_2 glicoproteína-I
CL	Cardiolipina
DE	Desviación estándar
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
FL	Fosfolípido
aFTC	Anticuerpos anti-fosfatidilcolina
aFTS	Anticuerpos anti-fosfatidilserina
aFTI	Anticuerpos anti-fosfatidilinositol
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

LEG	Lupus eritematoso generalizado
PBS	Solución salina de fosfatos
SaF	Síndrome de anti-fosfolípidos
SaFP	Síndrome de anti-fosfolípidos primario
SaFS	Síndrome de anti-fosfolípidos secundario
SBF	Suero bovino fetal
VDRL	Examen de laboratorio usado para diagnosticar sífilis (Veneral Disease Referente Laboratory)

INTRODUCCION

El síndrome de antifosfolípidos (SaF) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL), a títulos altos, con especificidad por fosfolípidos de carga negativa, neutros y/o sus cofactores en presencia de las siguientes manifestaciones clínicas: trombosis recurrentes arteriales y/o venosas, pérdida fetal recurrente¹⁻⁹ y/o hemocitopenias (principalmente anemia hemolítica autoinmune y trombocitopenia). Numerosos trabajos han mostrado asociación entre aCL y manifestaciones clínicas entre las que destacan síntomas neurológicos tales como migraña, corea, y mielitis transversa; alteraciones cutáneas como *livedo reticularis* y úlceras en miembros inferiores; anemia microangiopática, neuropatía o síndrome de Budd-Chiari, por mencionar algunas^{9,10}. Este síndrome puede presentarse de forma aislada, en cuyo caso se denomina SaF primario o también asociado a otras enfermedades autoinmunes, la más estudiada y mejor descrita cuando se presenta junto con el lupus eritematoso generalizado (LEG), en cuyo caso se le conoce como SaF secundario¹¹⁻¹⁵. Los mecanismos patogénicos de los aFL incluyen trombosis intervellositaria, infartos intravellositarios y vasculopatía decidual. Existen dos tipos de aFL asociados a un mal resultado reproductivo: los aCL y el anticoagulante lúpico (AL) e interfieren en forma directa con una variedad de proteínas anticoagulantes asociadas a los fosfolípidos promoviendo trombosis y vasculopatía¹⁶. Las pruebas de laboratorio más aceptadas para definir al SaF son: La detección en suero de títulos altos de anticuerpos aCL y anti- β_2 GP-I circulantes; y en plasma el anticoagulante lúpico (AL)¹⁷.

Algunos autores han reportado que la prevalencia del SaF oscila entre 3-200/100,000 habitantes, en base a la prevalencia del LEG en la población estudiada¹. El 82% de los pacientes afectados son mujeres, según Devine la relación mujer/hombre es de 2:1 en el SaFP mientras que para el SaFS es de 9:1. El diagnóstico de los pacientes con SaF se hace en el 85% de los casos entre los 15-50 años y en un 13 % aproximadamente el primer episodio ocurre a partir de los 50 años, en cuyo caso la prevalencia es mayor en varones (2:1), lo que sugiere una participación importante de las hormonas.

II. GENERALIDADES

2.1 Antecedentes históricos

Los aFL fueron reportados por primera vez en 1906 por Wasserman, quien describió una prueba de fijación de complemento para detectar la reagina en el suero de pacientes con sífilis¹⁸. Durante las siguientes tres décadas, se utilizaron extractos de tejidos normales como fuente de material antigénico para detectar la reagina mediante pruebas tales como la fijación de complemento (Wasserman, Khan) y la floculación (Venereal Disease Research Laboratory [VDRL]). En 1941, Pengborn demostró mediante extracciones alcohólicas de músculos de corazón bovino, que el antígeno unido por la reagina era un fosfolípido ácido¹⁹. Dicho fosfolípido fue llamado posteriormente cardiolipina (difosfatidilglicerol). Estudios realizados en población militar y civil durante la segunda guerra mundial, permitieron la identificación de individuos aparentemente sanos cuyas pruebas de laboratorio para sífilis fueron positivas²¹.

El desarrollo de la prueba de inmovilización treponémica por Nelson en 1949²¹, permitió la identificación diferencial de los individuos verdaderamente infectados con el treponema de los que tenían aFL pero que no estaban infectados. En 1952 Moore y Mohr²⁰ identificaron dos grupos de pacientes: uno con prueba falsa positiva transitoria (usualmente como resultado de la infección intercurrente) y un segundo grupo integrado por individuos persistentemente positivos (reactores crónicos biológicamente falsos positivos) que presentaban de igual manera prueba de inmovilización treponémica negativa por más de seis meses. Observó además, una asociación con padecimientos autoinmunes tales como LEG,

síndrome de Sjögren y artritis reumatoide. Existe una alta prevalencia de enfermedades autoinmunes en pacientes que presentan persistentemente prueba estándar para sífilis-biológicamente falsa positiva (PES-BFP)²⁰. En 1983 Harris EN y colaboradores publicaron la metodología para detectar anticuerpos anti-cardiolipina mediante radioinmunoensayo²² y en 1985 Loizou y colaboradores reportaron la metodología para detectar los mismos anticuerpos por ensayo inmunoenzimático. En 1990 se identificó que los aCL necesitan de la β_2 GP-I para ser identificados *in Vitro* (por su unión a fosfolípidos)²⁴⁻²⁶.

Rand²⁷ *et al* evaluaron la Anexina V como anticoagulante natural que actúa previniendo la trombosis en las vellosidades, manteniendo la fluidez de la circulación. Además se demostró que los anticuerpos aCL actúan sobre la anexina V disminuyendo los niveles de la proteína ²⁸.

2.2 Fisiopatogenia de los aFL

Los FL son moléculas de estructura simple con 3 componentes básicos: un grupo glicerol (diacilglicerol), un grupo fosfodiéster y una porción que puede tener diferentes grupos funcionales. La porción sustituible identifica a cada fosfolípido en particular de acuerdo a los componentes que se agregan (colina, serina, etanolamina e inositol, entre otros). El grupo fosfodiéster une la porción sustituida al diacilglicerol y es compartido por todos los fosfolípidos aniónicos.

Los fosfolípidos aniónicos (cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico), son reconocidos por los aPL a diferencia de los fosfolípidos neutros. La célula endotelial en reposo expresa en la cara externa de su membrana

citoplásmica fosfolípidos neutros (vg. esfingomielina y fosfatidilcolina) y en la cara interna, fosfolípidos aniónicos (vg. fosfatidilserina e inositol). La activación de la célula endotelial induce el cambio de los FL, de la cara interna a la externa, por la acción de una amino translocasa específica dependiente de calcio. Esta enzima invierte parcialmente el sentido de la disposición de la bicapa fosfolipídica. La consecuencia resultante es asimétrica en la distribución fosfolipídica de la superficie externa de la membrana de la célula endotelial²⁹. La presencia de FTS induce la activación del factor X y de la presencia e interacción de los factores IXa, VIIIa y protrombinasa fig 1. La expresión permanente de fosfolípidos aniónicos aumenta la adhesión de proteínas catiónicas como la β_2 GP-I. Este concepto sugirió que la naturaleza del receptor de la β_2 GP-I en la célula endotelial podría ser fosfolipídica³⁰.

Los FL son estructuras poco antigénicas y aunque tradicionalmente se consideró que los fosfolípidos aniónicos eran los blancos de los aFL, la situación es más compleja. El paradigma actual es que los aFL patogénicos reconocen epítopes localizados en el complejo formado por FL y proteínas séricas o en las proteínas séricas solas como la β_2 GP-I y la protrombina^{6,31}.

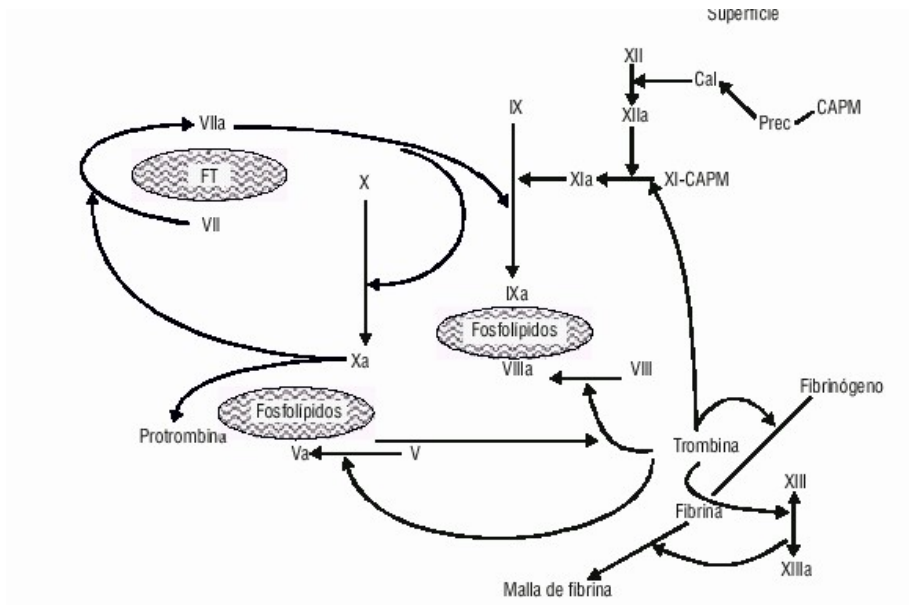


Fig. 1 Papel de los fosfolípidos en la cascada de coagulación

2.3 Anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL)

Los aFL son una familia de inmunoglobulinas de isotipos IgG, IgM e IgA que están inducidos por fosfolípidos aniónicos de las membranas celulares y proteínas plasmáticas, que actúan como cofactores³². Estos cofactores son la β 2GPI, la protrombina, la proteína C, proteína S y la anexina V³³, entre otros. La presencia de estos aFL en individuos puede ser ocasionada por diversas circunstancias, entre las que destacan las siguientes: 1.- como anticuerpos naturales, en cuyo caso son autoanticuerpos codificados por genes de línea germinal; 2.- como resultado de la interacción de factores inmunogenéticos y ambientales; 3.- como consecuencia de una des-regulación inmune y/o activación policlonal intrínseca de una enfermedad autoinmune; 4.- como anticuerpos anti-idiotipo de otros anticuerpos; 5.- inducidos por fármacos, y 6.- como resultado de procesos infecciosos, en cuyo caso, la génesis de los anticuerpos aFL está dirigida por antígenos.

2.4 Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SaF)

El primer informe de las manifestaciones clínicas del SaF fue publicado en 1963, año en el que Bowie y colaboradores describieron que los pacientes con LEG podían presentar trombosis y AL³⁴. La relación de manifestaciones trombóticas con la presencia de aFL y/o AL fue establecida años después por Alarcón-Segovia y colaboradores, quienes mostraron que los pacientes con síndromes obstructivos vasculares tenían una alta prevalencia de inhibidores de la coagulación y prueba VDRL positiva³⁵; ambos se relacionaron a su vez con la presencia de anticuerpos aCL. Posteriormente, surgieron en la literatura numerosos reportes que asociaban trombosis y/o pérdidas fetales con la presencia del AL³⁶⁻³⁷.

El desarrollo de pruebas específicas para detectar los aCL permitió a Hughes y colaboradores en 1986³⁸ identificar en pacientes con LEG, la asociación entre diversas manifestaciones clínicas, incluyendo los síndromes vasculares periféricos y los aCL³⁸; lo anterior culminó con la descripción del síndrome de anti-cardiolipina.

La descripción del síndrome de aCL por Hughes y colaboradores, originó una serie de artículos^{22,38-41} en los cuales se estableció la asociación entre pérdidas fetales recurrentes, trombosis venosa, infartos cerebrales, trombocitopenia y gangrena, con los aCL circulantes. Posteriormente, en 1989 Alarcón-Segovia y colaboradores publicaron los resultados del estudio de una cohorte de 500

pacientes consecutivos con LEG. En dicho trabajo definieron las manifestaciones clínicas del SaF (tabla 1)⁴².

TABLA 1. Manifestaciones clínicas asociadas a la presencia de aCL de isotipos IgG o IgM.

Manifestación (n)	% de positivos [†]	Valor de P	RM	IC 95%
A. Isotipo IgG				
Pérdida fetal recurrente (36)	64	0.00000001	10.54	4.38 - 25.78
Trombosis venosa (43)	35	0.031	2.06	1.00 - 4.19
Trombosis venosa recurrente (14)	71	0.00008	10.50	2.71 - 37.36
Trombocitopenia (88)	20	0.0017	2.06	1.28 - 3.60
B. Isotipo IgM				
Ulceras en piernas (15)	53	0.0005	5.30	1.69 -16.76
<i>Livedo reticularis</i> (162)	25	0.019	1.72	1.06 - 2.80
Anemia hemolítica (25)	36	0.001	2.63	1.00 - 6.90

Tomada de la referencia 34.. Abreviaturas: RM: razón de Momios; IC: intervalo de confianza. † Los datos representan ≥ 5 DE por arriba de la media de 100 controles; todas las variables fueron también significativas a ≥ 2 DE.

Los criterios preliminares para la clasificación de SaF en pacientes con LEG fueron documentados en 1992 por Alarcón-Segovia y colaboradores⁴³. Esta clasificación fue modificada de acuerdo con los criterios para el diagnóstico de SaF del Séptimo Simposio Internacional Sobre Anticuerpos Anti-Fosfolípidos. Durante el octavo simposio (realizado en Sapporo, Japón en 1998) se logró un consenso sobre los criterios o condiciones que deben reunir los pacientes para considerarse afectados por el SaF⁴⁴. Según estos criterios en el SaF definido, el paciente reúne dos condiciones clínicas y presencia aFL a títulos altos en dos determinaciones con 6 meses de diferencia, queda excluida la presencia de trombocitopenia y otros criterios clínicos menores. Estos criterios fueron validados al compararlos con los del Colegio Americano de Reumatología (CAR) lográndose

una especificidad del 98% y sensibilidad del 71% para la clasificación de los pacientes con SaF primario y asociado a LEG⁴⁵. En el Noveno simposio (Tours, Francia. 2000) se consideró la definición de otras dos categorías de SaF: probable y posible. En un estudio de pacientes con LEG publicado en 1997, Drenkard y colaboradores observaron una fuerte asociación entre vasculitis y títulos altos de aFL⁴⁶.

Es importante recalcar que existen múltiples manifestaciones clínicas que se presentan en los pacientes con SaF (tabla 2), lo cual sugiere que más de un mecanismo fisiopatológico puede estar generando las alteraciones sistémicas.

Oclusiones arteriales
Hipertensión arterial
Mielitis transversa
Vegetación valvular
Insuficiencia adrenal
Migraña
Corea
Síndrome de Budd-Chiari
Microangiopatía trombótica renal
Preeclampsia
Oclusiones arteriales de la retina
Amaurosis fugax

TABLA 2. Otras manifestaciones clínicas asociadas a los aCL. Tomado de la referencia 47

2.5 Anexina V

La anexina V (AN-V) también llamada proteína anticoagulante placentaria o endonexina II, es una glicoproteína de 37 KD dependiente de calcio con una potente capacidad anticoagulante *in vitro*⁴⁸, debida a su gran afinidad por los fosfolípidos de membrana cargados negativamente, inhibe la actividad de los complejos protrombinasa y Xasa, y reduce la adhesión y agregación plaquetarias⁴⁹. La AN-V circulante liberada de células presentes en la pared vascular (células endoteliales, musculares lisas) o células secretoras del hígado o bazo, en el plasma puede unirse a plaquetas y eritrocitos o a las células endoteliales⁵⁰. Se ha reportado que la AN-V puede formar un «escudo antitrombótico» alrededor de los fosfolípidos, desplazando los factores de la coagulación de la superficie de éstos⁵¹, siendo capaz de inhibir los complejos protrombinasa y Xasa, así como de reducir la adhesión y agregación plaquetarias⁵⁰. Además, la AN-V posee alta afinidad por células apoptóticas, ya que éstas exponen gran cantidad de FL de carga negativa, principalmente fosfatidilserina⁴⁹. Por otro lado, se ha propuesto que la AN-V podría desempeñar un papel fundamental en los mecanismos trombogénicos de los anticuerpos aFL⁵².

La anexina V es una potente proteína anticoagulante localizada en la placenta que actúa como principal cofactor para los aFL interfiriendo o compitiendo por los fosfolípidos de carga aniónica (sitio de unión de los aFL)⁵³.

También se reportó que fracciones de IgG de pacientes con aFL reducen la presencia de AN-V en cultivos de células trofoblásticas y endoteliales⁴⁹, produciendo un incremento en la cantidad de FL aniónicos capaces de activar la coagulación⁴⁸. Se sabe que la presencia de aFL se ha asociado a un estado de hipercoagulabilidad⁵⁴.

III. JUSTIFICACION

El SaF es una entidad patológica de la cuál no se conoce su prevalencia e incidencia en México. En pacientes con LEG varios autores han determinado su prevalencia e incidencia de forma indirecta.

La epidemiología del SaF ha sido estudiada en algunos centros de concentración en nuestro país, sin embargo, en éstos estudios los puntos de cohorte que se han tomado en consideración para los diferentes autoanticuerpos están basados en poblaciones anglosajona, asiática o negra ya que no se habían establecido los valores normales en nuestra población.

IV. OBJETIVO GENERAL:

- Establecer los valores de referencia para los anticuerpos aFL/cofactores: anti-AN-V (aAN-V) isotipos IgG e IgM, aCL libre de β_2 GP-I, anti--protrombina (aPt), anti-fosfatidilinositol (aFTI), anti-fosfatidilserina (aFTS), anti- β_2 glicoproteína-I (a β_2 GP-I), anti-complejo CL/ β_2 GP-I y anti-ácido fosfatídico (aAF) detectados en una población sana de México.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar la prevalencia de los aAN-V en pacientes mexicanos con SaFP y en pacientes con SaF asociado a LEG.
- Determinar la correlación entre anticuerpos aFL/cofactores y manifestaciones trombóticas y citopénicas en los pacientes con SaFP y asociados a LEG
- Determinar los puntos de corte de los anticuerpos a β_2 GP-I, aCL libre de β_2 GP-I, aPt, aAN-V, aAF, aFTI y FTS.

V. PACIENTES Y METODOS

5.1 Pacientes y controles

Estudiamos 85 sujetos sanos, 31 pacientes de los cuales: 17 tienen SaFP y 14 SaF asociado a LEG.

Pacientes: Con diagnóstico de SaFP. Individuos que reunieron los criterios de clasificación para pacientes con SaFP propuestos por Alarcón Segovia y colaboradores en 1989 ⁴³.

Con SaF asociado a LEG. Individuos que reunieron los criterios de clasificación de Sapporo ⁴⁴, para SaF y los del Colegio Americano de Reumatología para LEG. Los individuos estudiados fueron pertenecientes consecutivos que asistieron a la consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología (INC) o a la consulta de Reumatología del Centro Médico ABC en el periodo comprendido entre marzo y agosto del 2005.

Controles: Sujetos clínicamente sanos, de ambos sexos de 18 a 60 años que acudieron al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) y cuya serología para VDRL, Hepatitis B, C y VIH resultó negativa.

5.2 Métodos

Las muestras obtenidas de pacientes y controles se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Se les asignó un número de identificación y permanecieron almacenadas a - 20°C hasta su posterior uso en las determinaciones.

5.3 Manejo y almacenamiento

Una vez iniciados los estudios, las muestras se conservaron entre 2 y 8°C, al resguardo de la luz. Las microplacas de ELISA para cada determinación se sacaron de su envoltura y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, se evitó la acción directa de la luz sobre la solución del cromógeno.

5.4 Protocolo del equipo automatizado DSX para microELISA

Para realizar las diferentes determinaciones por el método de ELISA, se utilizó el equipo automatizado DSX de la compañía Dynex Technologies en donde se siguió todo el protocolo del equipo, el cuál consiste en que comprobar antes de cualquier determinación que el equipo funcione adecuadamente en todos sus componentes (lavador, lector y cajón), aplicación de las diferentes soluciones por el peine y aplicación correcta de los volúmenes de lavado. El equipo se programó para realizar 3 lavados entre cada incubación. Después en la programación, preparación de las placas, controles, reactivos (diluyente, conjugado, substrato, solución de paro y solución de lavado) todos productos comerciales provistos por IANSA. SA de CV de las marcas Orgentec Diagnostika GmbH o The Binding Site.

5.5 Control de Calidad.

El control de calidad se realizó en cada ensayo con los controles de los equipos comerciales, los cuales son de concentraciones conocidas y proporcionados por los equipos comerciales.

5.6 Método de cálculo.

El equipo DSX esta programado para construir una curva, interpolando los datos de las lecturas y proporcionando los resultados en densidad óptica y en U/mL.

5.7 Cuantificación de anticuerpos aAN-V

La cuantificación de los anticuerpos a-AN-V de isotipos G e M se realizó mediante ELISA. Los equipos son de la marca Orgentec Diagnostika GmbH.

Principio de la prueba

Las placas de ELISA están sensibilizadas con AN-V humana. Los calibradores, controles y muestras de pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los autoanticuerpos al antígeno durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los anticuerpos que no se unieron a la AN-V, se agregan anticuerpos producidos en conejo anti-IgG o IgM humana (específico contra cadenas γ o μ , respectivamente) los cuales están conjugados con peroxidasa. El conjugado se une a los auto-anticuerpos humanos y el exceso del conjugado que no reaccionó se elimina por un paso posterior de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el substrato 3,3',5,5'–

tetrametilbenzidina (TMB) el cual, por acción de la peroxidasa cambia a azul transparente. La intensidad de color es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las muestras. Para detener la reacción se agrega ácido fosfórico, el cual acidifica el medio y hace que la coloración azul cambie a amarillo. La absorbancia se lee a 450 nm.

5.8 Cuantificación de anticuerpos aCL

La determinación de los aCL isotipos G, A y M se realizó con la técnica de ELISA. Los equipos que se usaron fueron de la marca The Binding Site, proporcionados por IANSA. SA de CV.

Principio de la prueba

Las placas de ELISA están sensibilizadas con cardiolipina de corazón de bovino y bloqueadas con suero bovino fetal, el cual es una fuente de β_2 GP-I. Los calibradores, controles y muestras de los pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los autoanticuerpos al complejo CL- β_2 GP-I durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los anticuerpos que no se unieron al complejo, se agregan anticuerpos producidos en conejo anti-IgM, IgA o IgG humanas (específico contra cadena μ , α y γ respectivamente) los cuales están conjugados con peroxidasa. El conjugado se une a los anticuerpos humanos y el exceso del conjugado que no reaccionó se elimina por un paso posterior de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) el cual da un color azul producto

de la reacción enzimática. La intensidad de la coloración es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las muestras. Para detener la reacción se agrega ácido fosfórico, el cual acidifica el medio e induce cambio de coloración a amarillo. La absorbancia se lee a 450 nm.

5.9 Cuantificación de anticuerpos anti-protrombina

La cuantificación de los anticuerpos aPt isotipos G y M se realizó por la técnica de ELISA. Los equipos de la marca Orgentec Diagnostika GmbH fueron provistos por la compañía IANSA. SA de CV.

Principio de la prueba

Las placas de ELISA están sensibilizadas con protrombina humana altamente purificada. Los calibradores, controles y muestras de pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los autoanticuerpos a la protrombina durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los auto-anticuerpos que no se unieron a la protrombina, se agregan anticuerpos producidos en conejo anti-IgG o IgM humana (específico contra cadena γ o μ respectivamente), los cuales están conjugados con peroxidasa. El conjugado se une a los autoanticuerpos humanos y el exceso del conjugado que no reaccionó se elimina por un paso subsecuente de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el substrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) el cual da un color azul producto de la reacción enzimática. La intensidad de color es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las

muestras. Para detener la reacción se agrega ácido fosfórico, el cual acidifica el medio y produce una coloración amarilla. La absorbancia se lee a 450 nm.

5.10 Cuantificación de anticuerpos a β_2 GP-I

La cuantificación de los anticuerpos a β_2 GP-I isotipos G, M y A se realizó mediante ELISA. Los equipos de la marca The Binding Site fueron proporcionados por la compañía IANSA.

Principio de la prueba

Las placas de ELISA están sensibilizadas con β_2 GPI purificada humana. Los calibradores, controles y muestras de pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los autoanticuerpos a la β_2 GPI durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los anticuerpos que no se unieron a la β_2 GPI, se agregan anticuerpos producidos en conejo anti-IgA, IgM o IgG humana (específico contra cadenas α , μ o γ respectivamente) los cuales están conjugados con peroxidasa. El conjugado se une a los auto-anticuerpos humanos y el exceso del conjugado que no reaccionó se elimina por un paso subsecuente de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) el cual da un color azul producto de la reacción enzimática. La intensidad es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las muestras. Para detener la reacción se agrega ácido fosfórico, el cual acidifica el medio y produce una coloración amarilla. La absorbancia de lee a 450 nm.

5.11 Cuantificación de anticuerpos anti-complejo CL/ β_2 GP-I isotipos G y M

La cuantificación de los anticuerpos anti-complejo CL/ β_2 GP-I isotipos G y M se realizo mediante ELISA.

Principio de la prueba

Las placas de ELISA están sensibilizadas con CL y bloqueadas con suero bovino fetal (SBF). La poza de los sueros normales, los controles y las muestras de pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los anticuerpos al complejo CL/ β_2 GP-I, durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los anticuerpos que no se unieron al complejo CL/ β_2 GP-I se agregan anticuerpos anti-IgG o IgM humana marcadas con FTA. El conjugado se une a los autoanticuerpos humanos y el exceso del conjugado que no reaccionó después de la incubación, se elimina por un paso posterior de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el substrato p-nitrofenilfosfato (SIGMA) el cual es transformado por la enzima fosfatasa alcalina obteniéndose una coloración azul. La intensidad del color es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las muestras.

Procedimiento de la prueba

Primero se sensibilizaron placas de poliestireno no irradiadas de 96 pozos con 50 μ l/pozo de cardiolipina a una concentración de 50 μ g/ml, disuelta en alcohol

etélico. El etanol se evaporó con nitrógeno gas durante 30 minutos. Una vez evaporado el etanol, se bloquearon los sitios inespecíficos con 350 µl de una solución al 10% de suero bovino fetal (SBF, SIGMA) en PBS (NaCl 0.15M, Na₂HPO₄ 0.01M, KH₂PO₄ 0.01M pH 7.4) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces con 350 µl de PBS/pozo, se secaron mediante golpeteo contra una superficie absorbente y se dejaron boca abajo. La muestras, la poza de sueros normales y los controles se diluyeron 1:50 en SBF al 10% en PBS y se adicionaron 200 µl/pozo de la dilución de acuerdo al siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	6	14	22	27	35						
B	Pool	7	15	23	28	36						
C	C1+1:50	8	16	24	29	37						
D	1	9	17	Blanco	30	38						
E	2	10	18	Pool	31	39						
F	3	11	19	C+ 1:100	32	Blanco						
G	4	12	20	25	33	Pool						
H	5	13	21	26	34	C+ 1:200						

Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se hicieron tres lavados con incubaciones de 3 minutos en cada uno y se escurrieron mediante golpeteo. Se agregaron 200 µl por pozo del conjugado anti-IgG o IgM humanas diluido 1:10,000 en SBF a 10 % y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se hicieron 3 lavados con PBS y se secaron las placas como se menciono anteriormente. Se agregaron

200 µl/pozo del sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato, SIGMA), disuelto en solución amortiguadora de dietanolamina pH 9.8 y se incubaron las placas a 37°C una hora en la oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en lector de micro-ELISA (Tecan, SUNRISE).

5.12 Cuantificación de anticuerpos anti-ácido fosfatídico

La detección de anticuerpos aAF isotipo G se realizó mediante ELISA.

Principio de la prueba

Los calibradores, los controles y las muestras de pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los autoanticuerpos al antígeno durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los anticuerpos que no se unieron al ácido fosfatídico, se agrega el conjugado producido en conejos anti-IgG o IgM humana. El conjugado se une a los autoanticuerpos humanos y el exceso que no reaccionó se elimina por un paso posterior de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el sustrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina(TMB) el cual cambia de color de transparente a azul como resultado de la reacción enzimática. La intensidad de color es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las muestras. Para detener la reacción se agrega ácido fosfórico, el cual acidifica el medio provocando cambio de coloración de azul a amarillo. La absorbancia se lee a 450 nm.

5.13 Cuantificación de anticuerpos anti-fosfatidilinositol

La detección de anticuerpos aFTI isotipo IgG se realizó mediante ELISA. El equipo de la marca Orgentec Diagnostika GmbH fue adquirido con la compañía IANSA. SA de CV.

Principio de la prueba

Las placas de ELISA están sensibilizadas con FTI. Los calibradores, controles y las muestras de pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los autoanticuerpos al FTI durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los anticuerpos que no se unieron al FTI, se agrega el conjugado anti-anti-IgG humana. El conjugado se une a los autoanticuerpos humanos y el exceso del conjugado que no reaccionó se elimina por un paso posterior de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) el cual se transforma de transparente a azul como resultado de la reacción enzimática. La intensidad de color es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las muestras. Para detener la reacción se agrega ácido fosfórico, el cual acidifica el medio y produce un cambio de coloración de azul a amarillo el cual se lee a 450 nm.

5.14 Cuantificación de anticuerpos anti-fosfatidilserina

La detección de anticuerpos aFTS isotipo IgG se realizó mediante ELISA. Los equipos de la marca Orgentec Diagnostika GmbH fueron adquiridos con la compañía IANSA. SA de CV.

Principio de la prueba

Las placas de ELISA están sensibilizadas con FTS. Los calibradores, controles y las muestras de pacientes se agregan a los pozos de las placas para que se lleve a cabo el reconocimiento y unión de los autoanticuerpos a la FTS durante la primera incubación del ensayo a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan los pozos para eliminar las proteínas inespecíficas y los anticuerpos que no se unieron al antígeno. Se agrega el conjugado anti-IgG humana y se incuba para permitir que se una a los autoanticuerpos humanos. El exceso del conjugado que no reaccionó se elimina por un paso posterior de lavado. La unión del conjugado se visualiza con el substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) el cual se transforma de transparente a azul como resultado de la reacción enzimática. La intensidad de color es proporcional a la concentración de autoanticuerpos presentes en las muestras. Para detener la reacción se agrega ácido fosfórico, el cual acidifica el medio provocando un cambio de coloración de azul a amarillo. La absorbancia se lee a 450 nm.

VI. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se usó el programa de computadora SPSS versión 12.0. Para las comparaciones de las variables se emplearon las pruebas de U de Mann-Whitney y la prueba exacta de Fisher, valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Los coeficientes de correlación entre las manifestaciones clínicas con la presencia de anticuerpos aFL/cofactor se estimaron con la prueba de Pearson de 2 colas, valores de $p < 0.01$ fueron considerados significativos.

VII. RESULTADOS

7.1 Características demográficas y clínicas de los sujetos estudiados.

7.1.1 Sujetos sanos

Estudiamos 85 sujetos sanos de los cuales 52 son mujeres (61.2%) con promedio de edad de 35.4 ± 11.2 años y 33 hombres (38.8%) con promedio de edad 35.4 ± 11.6 años.

7.1.2 Pacientes con SaFP

De los 31 pacientes estudiados 17 (54.8%) tienen SaFP de los cuales 14 (82.4%) son mujeres y con una media de edad de 40.0 ± 9.9 años y 3 (17.6%) hombres con media de edad de 38.3 ± 15.9 años.

7.1.3 Pacientes con SaFS

De los 31 pacientes con SaF estudiados 14 (45.2%) tienen SaF asociado a LEG (SaFS), de los cuales 12 (85.7%) son mujeres con media de edad de 34.54 ± 11.1 años y 2 (14.35) hombres con media de edad de 42 ± 12.1 años.

En la tabla 3 se resumen los datos demográficos de los 31 pacientes estudiados.

Tabla 3. Características demográficas de los pacientes con SaF.

Paciente	Sexo	Edad	SaF
1	M	51	SaFP
2	H	40	LEG
3	M	49	SaFP
4	M	28	SaFP
5	M	34	LEG
6	H	20	SaFP
7	M	41	SaFP
8	M	42	SaFP
9	M	40	LEG+SJ
10	M	35	LEG
11	M	19	LEG
12	M	46	SaFP
13	M	38	LEG
14	M	49	LEG
15	M	24	LEG
16	H	49	SaFP
17	M	26	SaFP
18	M	38	SaFP
19	M	39	SaFP
20	M	28	SaFP
21	H	46	SaFP
22	M	23	LEG
23	M	39	SaFP
24	M	43	LEG
25	M	23	LEG
26	M	49	SaFP
27	M	52	SaFP
28	M	52	SSj
29	H	55	LEG
30	M	24	SaFP
31	H	31	LEG

SaFP = Síndrome de antifosfolípidos primario; **LEG**= Lupus eritematoso generalizado, **SSj** = Síndrome de Sjögren.

7.1.4 Curvas de distribución de los autoanticuerpos cuantificados en la población sana y en los pacientes.

Los resultados obtenidos a partir de pruebas de estadística paramétrica en las determinaciones de los anticuerpos aAN-V isotipos G y M, aCL isotipos G, A y M, aPt isotipos IgG y IgM, aCL/ β_2 GP-I isotipos G y M, a β_2 GP-I isotipos G, A y M, aAF isotipo G, aFTI isotipo G y aFTS isotipo G se muestran en las gráficas de distribución de frecuencias.

a) Anticuerpos aAN-V isotipo G

El análisis descriptivo de los valores de aAN-V isotipo G de los sujetos sanos mostró: media= 4.54 U/mL, mediana=3.7 U/mL, rango 3.20-44.0. Figura 2.

En el caso de los pacientes, aquellos con SaFP tuvieron una media=5.05, mediana=4.5 U/mL, rango=4.0-10.2 y los pacientes con SaFS tuvieron una media 4.8, mediana 4.35 U/mL, rango 3.8-7.7; no observamos diferencias entre SaFP vs SaFS, $p=0.35$.

b) Anticuerpos aAN-V isotipo IgM

Los valores de aAN-V isotipo IgM en sujetos sanos tuvieron una media = 3.9 U/mL, mediana = 3.7 U/mL, rango de 3.10-8.10. Figura 2.

Los valores de aAN-V de isotipo M en pacientes con SaFP tuvieron una media = 3.81 U/mL, mediana = 3.7 U/mL, rango 3.3-4.5 y los pacientes con SaF

secundario mostraron una media = 3.54 U/mL, mediana = 3.5 U/mL, rango 3.4-4.1; observamos diferencias entre SaFP vs SaFS, $p=0.008$.

c) Anticuerpos aCL isotipo G

Los valores de aCL de isotipo G en sujetos sanos mostraron una media = 7.2, mediana = 5.3, rangos de 2.9-67.5. Figura 3

La media de los pacientes con SaFP fue de 33.9 U/mL, mediana = 9.2 U/mL, rangos 0.9-158.6 y en los pacientes con SaFS la media fue de 19.7 U/mL, mediana = 5.8 U/mL, rangos de 0.7-126.0. No observamos diferencias entre SaFP vs SaFS, $p=0.648$).

d) Anticuerpos aCL isotipo M

Los valores de aCL isotipo IgM en sujetos sanos tuvieron una media = 2.77 U/mL, mediana = 2.0 U/mL, rango de 1.2-19.7. Figura 3.

Los valores de aAN-V de isotipo M en pacientes con SaFP tuvieron una media = 20.8 U/mL, mediana = 10.1 U/mL, rango 3.7-134.6 U/mL. Pacientes con SaF secundario mostraron una media = 16.6 U/mL, mediana = 8.4 U/mL, rango 3.4-4.1; No observamos diferencia entre SaFP vs SaFS, $p=0.677$.

e) Anti-aCL-IgA

El análisis de los valores de los títulos de anti-aCL de isotipo IgA obtenidos en sujetos sanos mostró una media = 3.0 U/mL, mediana=2.7 U/mL, rango 2.0-22.8 U/mL, figura 3. En el caso de los pacientes, aquellos con SaFP tuvieron una

media=19.7 U/mL, mediana= 4.7 U/mL, rango 4.7-149.6 U/mL y los pacientes con SaFS tuvieron una media=7.56 U/mL, mediana= 4.7 U/mL, rango 3.6-32.9 U/mL, no observamos diferencias entre SaFP y SaFS, $p=0.889$.

f) Anti-Protrombina IgG

Los valores de anticuerpos anti-protrombina IgG en sujetos sanos mostraron una media= 5.7 U/mL, mediana= 3.8, rango 2.6-28.6, figura 4.

Los títulos de anti-protrombina IgG en pacientes con SaFP mostraron una media=25.7 U/mL, mediana 7.8, rango 4.0-189.6 U/mL y pacientes con SaFS mostraron una media=60.9 U/mL, mediana= 9.6 U/mL, rango= 3.2-392.3 U/mL); no hubo diferencias entre SaFP y SaFS, $p=0.551$.

g) Anti-protrombina IgM

Los valores de anti-protrombina IgM en sujetos sanos mostraron una media= 5.5 U/mL, mediana= 5.1 U/mL, rango 2.6-28.6 U/mL, figura 4. Los valores obtenidos en pacientes con SaFP revelaron una media= 3.37 U/mL, mediana= 2.9 U/mL, rango 2.1-6.3 U/mL y en pacientes con SaF secundario se obtuvo una media= 3.2 U/mL, mediana 2.8 U/mL, rango=2.2-5.1 U/mL; no hubo diferencias entre SaFP vs SaFS, $p=0.984$.

h) Anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I isotipo G

Los valores obtenidos de anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I isotipo G en sujetos sanos mostraron una media= 2.2 U/mL, mediana= 2.0 U/mL, rango= 1.7-6.9 U/mL,

Figura 5. Los valores obtenidos en pacientes con SaFP revelaron una media= 38.9 U/mL, mediana= 5.3 U/mL, rango=1.9-258.6 U/mL y en pacientes con SaFS se obtuvo una media= 49.6 U/mL, mediana= 2.85 U/mL, rango=1.8-565.2 U/mL, no observamos diferencias entre SaFP y SaFS, $p=0.439$.

i) Anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I isotipo M

Los valores obtenidos de anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I isotipo M en sujetos sanos mostraron una media= 2.5 U/mL, mediana= 2.0, rango= 1.5-12.80, figura 5. Los valores obtenidos en pacientes con SaFP mostraron una media = 14.1 U/mL, mediana = 3.1 U/mL, rango 1.4-126.1 U/mL y pacientes con SaFS mostraron una media = 10.9 U/mL, mediana = 5.3 U/mL, rango= 1.2-75.4 U/mL. No hubo diferencias entre SaFP y SaFS, $p=0.874$.

j) Anticuerpos $\alpha\beta_2$ GPI isotipo A

Los valores obtenidos de anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I isotipo en sujetos sanos mostraron una media= 4.05 U/mL, mediana 2.5 U/mL, rango 1.6-37.2 U/mL, figura 5. Los valores obtenidos en pacientes con SaFP revelaron una media= 9.8 U/mL, mediana= 4.9 U/mL, rango= 0.0-89.5 U/mL y pacientes con SaFS revelaron una media= 7.5 U/mL, mediana=2.9 U/mL, rango 0.0-49.2 U/mL. No observamos diferencias entre SaFP y SaFS, $p= 0.778$.

k) Anticuerpos aCL libre de β_2 GP-I isotipo G

Los valores obtenidos de anticuerpos aCL libre de β_2 GP-I isotipo G en sujetos sanos mostraron una media=0.96 U/mL, mediana= 0.8 U/mL, rango=-0.3-5.20 U/mL, fig 6.

Los valores obtenidos en pacientes con SaFP mostraron una media = 3.7 U/mL, mediana= 2.0, rango=0.4-12.8 U/mL y pacientes con SaFS mostraron una media= 2.6 U/mL, mediana=2.3 U/mL, rango 0.6-6.6 U/mL. No hubo diferencias entre SaFP y SaFS, $p= 0.842$.

l) Anticuerpos aCL libre de β_2 GP-I isotipo M

Los valores obtenidos de anticuerpos aCL libre de β_2 GP-I isotipo M en sujetos sanos mostraron una media= 0.85 U/mL, mediana= 1.1 U/mL, rango -9.0-3.9 U/mL, Figura 6. Los valores obtenidos en pacientes con SaFP presentaron una media=6.4 U/mL, mediana= 2.6 U/mL, rango=-3.6-33 U/mL y pacientes con SaFS una media= 6.0 U/mL, mediana 2.6 U/mL, rango -3.3-24.7 U/mL. No hubo diferencias entre SaFP y SaFS, $p= 0.721$.

m) Anticuerpos aAF isotipo G

Los valores obtenidos de anticuerpos aAF isotipo G en sujetos sanos mostraron una media= 3.46 GPL U/mL, mediana= 3.40 GPL U/mL, rango= 3.10-5.30 GPL U/mL, figura 7. Los valores obtenidos en pacientes con SaFP mostraron una media= 27.7 GPL U/mL, mediana 4.6 GPL U/mL, rango= 3.4-130.1 GPL U/mL y pacientes con SaFS mostraron una media= 7.9 GPL U/mL, mediana= 24.07 GPL

U/mL, rango 3.20-151.80 GPL U/mL. No hubo diferencias entre SaFP y SaFS $p=0.52$.

n) Anticuerpos aFTI isotipo G

Los valores de anticuerpos aFTI isotipo G en sujetos mostraron una media= 2.89 GPL U/mL, mediana=2.8 GPL U/mL, rango=2.40-6.20 GPL U/mL, figura 8.

Los valores encontrados en pacientes con SaFP revelan una media= 23.24 GPL U/mL, mediana 5.3 GPL U/mL, rango= 3.10-122.10 GPL U/mL y pacientes con SaFS media=22.5 GPL U/mL, mediana= 6.20 GPL U/mL, rango= 3.0-182.5 GPL U/mL. No hubo diferencias entre SaFP y SaFS, $p=0.438$.

o) Anticuerpos aFTS isotipo G

Los valores de anticuerpos aFTS isotipo G en sujetos sanos muestran una media= 4.36 U/mL, mediana= 4.3 U/mL, rango= 3.8-5.6, figura 9. Los valores encontrados en pacientes con SaFP presentaron una media = 27.2 GPL U/mL, mediana= 5.5 GPL U/mL, rango= 3.7-142.3 GPL U/mL y en pacientes con SaFS presentaron una media=25.77 GPL U/mL, mediana= 8.10 GPL U/mL, rango= 3.8-198.0 GPL U/mL. No hubo diferencias entre SaFP y SaFS, $p=0.301$.

Curvas de distribución de los Ac cuantificados en la población sana

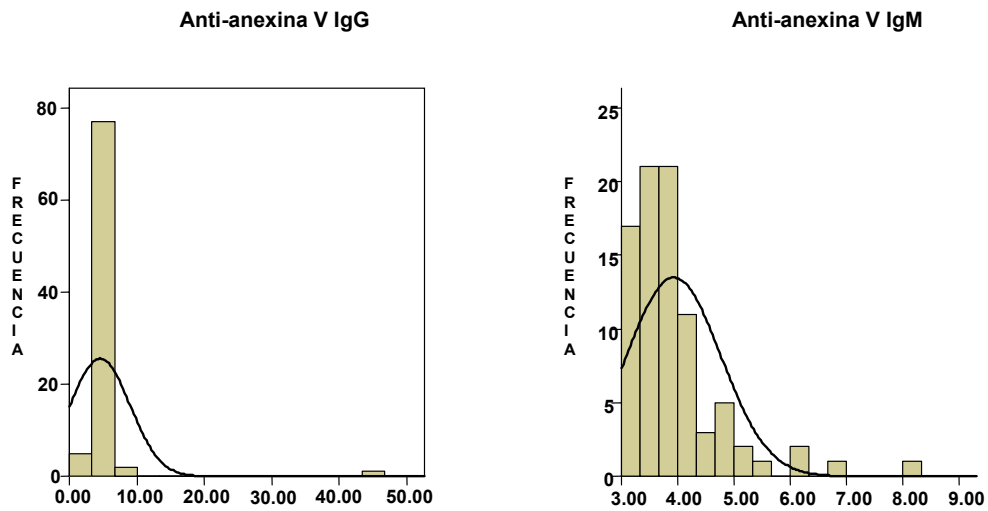


Figura 2. Distribución de los Anticuerpos Anti-anexina V isotipo IgG e IgM.

Curvas de distribución de los Ac cuantificados en la población sana

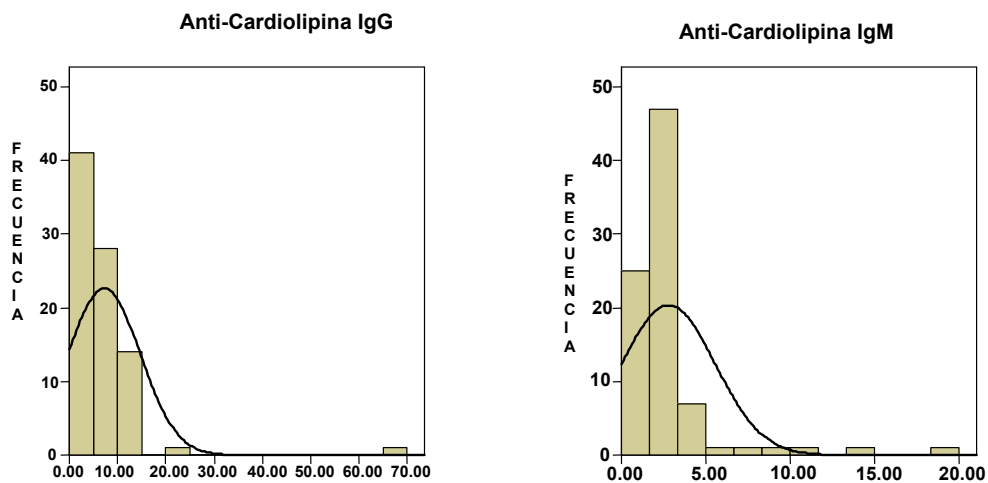


Figura 3. Distribución de los anticuerpos aCL isotipos IgG e IgM.

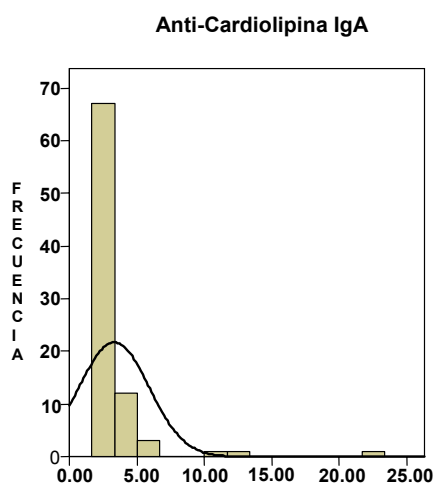


Figura 3. Distribución de los anticuerpos aCL isotipo IgA.

Curvas de distribución de los Ac cuantificados en la población sana

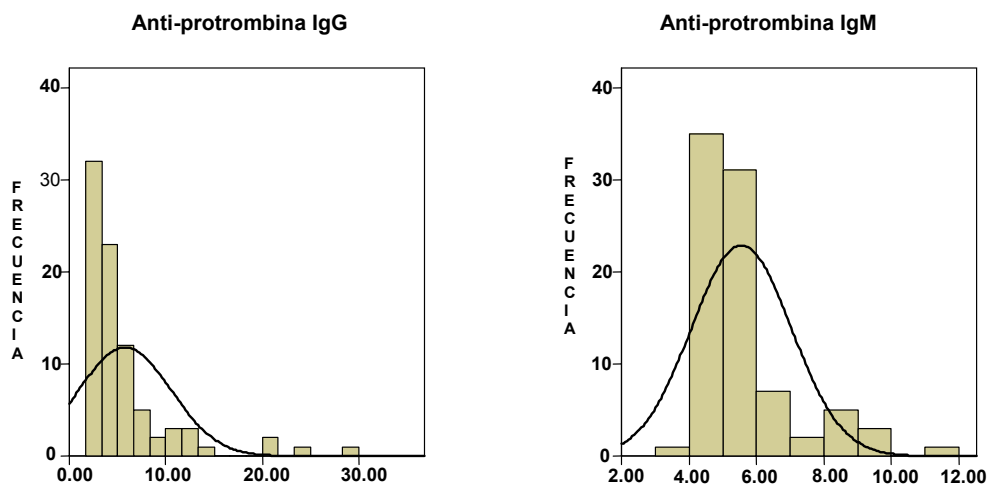


Figura 4. Distribución de los anticuerpos aPt isotipos IgG e IgM.

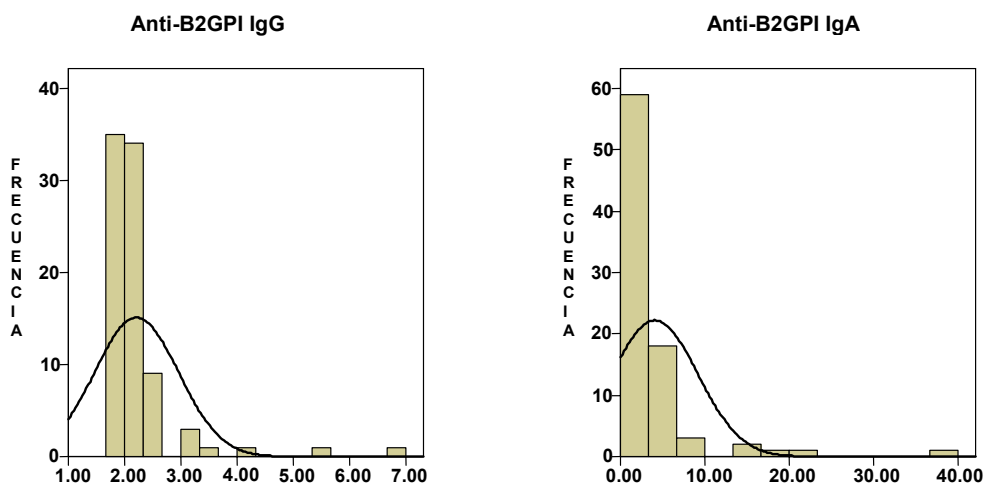


Figura 5. Distribución de los anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I isotipos IgG e IgA.

Curvas de distribución de los Ac cuantificados en la población sana

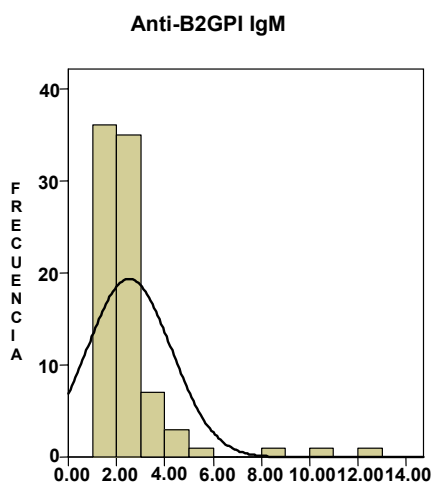
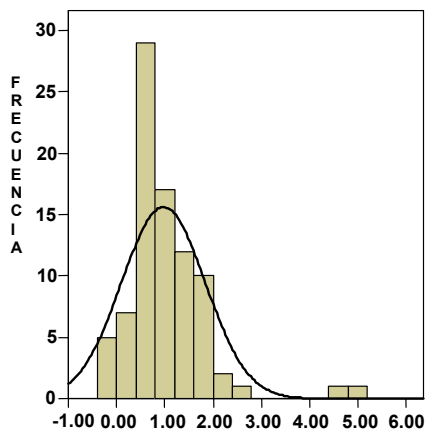


Figura 5. Distribución de los anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I isotipos IgM.

Anticuerpos aCL libre de β_2 GP-I isotipo G



Anticuerpos aCL libre de β_2 GP-I isotipo M

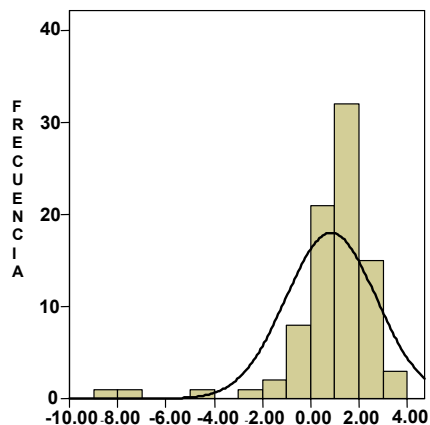


Figura 6. Distribución de los anticuerpos aCL libre de β_2 GP-I isotipo IgG e IgM.

Curvas de distribución de los Ac cuantificados en la población sana

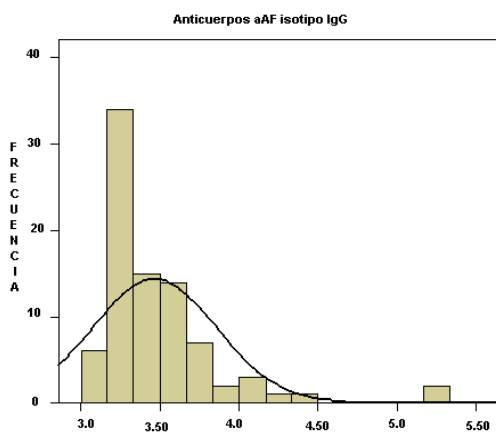


Figura 7. Distribución de los anticuerpos aAF isotipo IgG

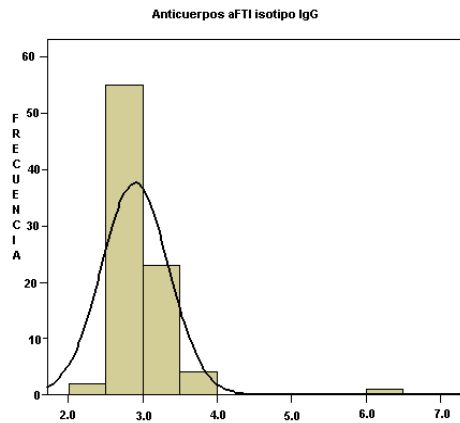


Figura 8. Distribución de los anticuerpos aFTI isotipo IgG

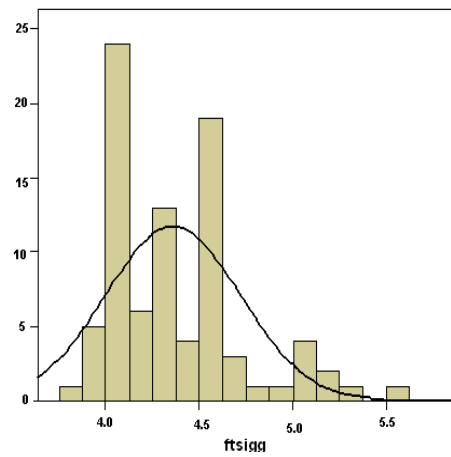


Figura 9. Distribución de los anticuerpos aFTS isotipo IgG.

7.1.5 Valores de referencia de los anticuerpos e isotipos estudiados en la población normal.

Para obtener los valores de referencia se utilizaron pruebas de estadística inferencial no paramétrica utilizando el percentil 90. En la tabla 4 se muestran los valores obtenidos del análisis de la población estudiada. Como se puede ver existe una gran diferencia con respecto a los descritos en población anglosajona.

DETERMINACION	ISOTIPOS		
	IgG	IgM	IgA
Anti-anexina V	≤ 5.6 U/mL	≤ 4.8 U/mL	ND
aCL	≤ 11.5 GPL U/mL	≤4.4 MPL U/mL	≤4.34 APL U/mL
Anti-Protrombina	≤ 11.5 U/mL	≤8.1 U/mL	ND
Anti-β2GP-I	≤ 2.5 U/mL	≤ 3.4 U/mL	≤ 6.3 U/mL
Anti-CL libre de β2GPI	≤ 1.9 UA	≤ 2.6 UA	ND
Anti-Ac. Fosfatídico	≤ 3.9 GPL U/mL	ND	ND
Anti-Fosfatidilinositol	≤ 3.2 GPL U/mL	ND	ND
Anti-Fosfatidilserina	≤ 4.94 GPL U/mL	ND	ND

Tabla 4. Muestra los valores de referencia de anticuerpos aFL/cofactores obtenidos en una población sana de México.

Con los valores de referencia establecidos se compararon los títulos de anticuerpos entre pacientes y controles y se encontró que los anticuerpos anti-anexina V IgM (3.6 ± 0.3 vs 3.9 ± 0.8), aCL/β₂GP-I IgG (27.5 ± 45.1 vs 7.1 ± 7.4), aβ₂GP-I-IgA (8.7 ± 17.7 vs 4.0 ± 5.0), no mostraron diferencias significativas ($p=0.414$, $p=0.508$ y $p=0.933$ respectivamente). Todos los demás anticuerpos

estudiados si mostraron diferencias significativas. Tabla 5. Además, para aAN-V isotipo M y aPt isotipo IgM no hubo ningún paciente positivo.

Anticuerpos	Isotipo	Pacientes (n=31)	Controles (n=85)	Valores P
aAN-V	IgG	4.9±1.4	4.5±4.4	<0.001
	IgM	3.6±0.3	3.9±0.8	NS
Anti-CL/β ₂ GP-I	IgG	27.5±45.1	7.1±7.4	NS
	IgA	18.9±27.4	2.7±2.7	<0.001
	IgM	14.2 ±29.5	3.3±2.5	<0.001
aCL	IgG	3.2±3.0	0.9±0.8	<0.001
	IgM	6.2±10.1	0.8±1.8	<0.001
aβ ₂ GP-I	IgG	43.7±111.4	2.2±0.7	<0.001
	IgA	8.7±17.7	4.0±5.0	NS
	IgM	12.7±26.2	2.5±1.7	<0.001
aPt	IgG	41.6±91.9	5.7±4.7	<0.001
	IgM	3.3±1.7	5.5±1.4	<0.001
aAF	IgG	26.08±39.01	3.4±0.39	<0.001
aFTI	IgG	22.3±39.42	2.8±0.45	<0.001
aFTS	IgG	26.55±44.72	4.36±0.36	<0.001

Tabla 5. Comparación entre los títulos de anticuerpos aFL/cofactores presentes en pacientes y controles. Los datos se expresan en promedio ± DE. Abreviación NS: no significativo.

7.1.6 Prevalencia de anticuerpos aFL/cofactores en pacientes con SaF.

El 9.4 % (8/85) de los controles mostraron títulos altos de aAN-V isotipo G, aAN-V IgM, aCL/ β₂GP-I-IgA, aCL/ β₂GP-I-IgM, aPt IgG, aβ₂GP-I IgG, aβ₂GP-I-IgM, aβ₂GP-I-IgA, aCL IgM y aFTS IgG, en tanto que el 8.23% (7/85) lo fue para aPt

IgM, aAF IgG y aFTI IgG, el 7.05% (6/85) fueron positivos para aCL IgG, y el 17.6% (15/85) tuvieron anticuerpos anti complejo CL/ β 2GP-I de IgG.

El 22.5% (7/31) de los pacientes con SaF tuvieron anticuerpos aAN-V de isotipos G, 61.3% (19/31) anti-complejo CL/ β 2GP-I isotipo A y aFTS isotipo G. El 90.3% (28/31) tuvieron anticuerpos anti-complejo CL/ β 2GP-I isotipo M, aFTI isotipo G, 64.5% (20/31) tuvieron a β 2GP-I isotipo G, 41.9% (13/31) tuvieron anticuerpos anti-complejo CL/ β 2GP-I isotipo G, aPt isotipo G, a β 2GP-I isotipo A, 80.6% (25/31) aAF, 48.3% (15/31) tuvieron a β 2GP-I isotipo M, aCL isotipo M y 54.8% (17/31) tuvieron positivos aCL isotipo G. Tabla 6.

Anticuerpos	Controles (n=85)	Pacientes (n=31)	Valores P
Anti-anexina V-IgG	8/85	7/31	NS
Anti-anexina V-IgM	8/85	0/31	NS
aCL/β2GP-I-IgG	8/85	13/31	<0.001
aCL/β2GP-I-IgA	8/85	19/31	<0.001
aCL/β2GP-I-IgM	8/85	28/31	<0.001
Anti-Protrombina IgG	8/85	13/31	<0.001
Anti-Protrombina IgM	7/85	0/31	NS
Anti-β2GP-I- IgG	18/85	20/31	<0.001
Anti-β2GP-I-IgA	8/85	13/31	<0.001
Anti-β2GP-I-IgM	8/85	15/31	<0.001
Anti-aCL-IgG	6/85	17/31	<0.001
Anti-aCL-IgM	8/85	15/31	<0.001
Anti-ac. Fosfatídico IgG	7/85	25/31	<0.001
Anti-Fosfatidilserina IgG	8/85	19/31	<0.001
Anti-Fosfatidilinositol IgG	7/85	28/31	<0.001

Tabla 6. Anticuerpos aFL/cofactores positivos en pacientes y controles.

NS = no significativo.

7.1.7 Prevalencia de Ac aFL/cofactores en pacientes con SaFP y SaFS.

Cuando comparamos los títulos de los anticuerpos anti-fosfolípidos/cofactores en los pacientes con SaFP vs SaFS se observó lo siguiente: 1) no hubo diferencia con respecto a los aAN-V isotipo G (4.8 ± 1.2 vs 5.0 ± 1.5 ; $p=0.377$), anti-complejo CL/ β 2GP-I isotipo G (19.7 ± 33.6 vs 33.9 ± 52.9 ; $p=0.653$), isotipo A (7.5 ± 7.6 vs 19.7 ± 38.9 ; $p=0.891$) e isotipo M (816.6 ± 18.8 vs 20.8 ± 33.3 ; $p=0.681$); aPt isotipo G (60.9 ± 126.9 vs 25.9 ± 46.4 ; $p=0.570$), isotipo M (3.2 ± 0.9 vs 3.3 ± 1.3 ; $p=0.984$), a β 2GP-I isotipo G (49.6 ± 149.1 vs 38.9 ± 71.6 ; $p=0.444$), isotipo M (10.9 ± 19.4 vs 14.1 ± 31.2 ; $p=0.891$) e isotipo A (7.5 ± 12.9 vs 9.8 ± 21.2 ; $p=0.799$); aCL isotipo G (2.6 ± 1.9 vs 3.7 ± 3.8 ; $p=0.860$) e isotipo M (6.0 ± 8.6 vs 6.4 ± 11.5 ; $p=0.739$), aAF isotipo G (27.7 ± 39.5 vs 24.0 ± 39.7 ; $p=0.524$); aFTS isotipo G (27.2 ± 40.43 vs 25.7 ± 51.0 ; $p=0.301$); aFTI isotipo G (23.24 ± 33.02 vs 22.5 ± 47.09 ; $p=0.438$), aAN-V isotipo IgM (3.5 ± 0.1 vs 3.8 ± 0.3 ; $p=0.008$) respectivamente.

La tabla 7 muestra el porcentaje de pacientes con títulos altos de aFL/cofactores en SaFP y SaFS.

Anticuerpos	SaFP (n=17)	SaFS (n=14)	Valor de P
Anti-anexina V-IgG	4(24%)	3(21%)	NS
Anti-anexina V-IgM	Ninguno (+)	Ninguno (+)	NS
aCL/β2GP-I- isotipo	5(36%)	8(47%)	NS
aCL/β2GP-I-IgA	8(57%)	11(64%)	NS
aCL/β2GP-I-IgM	13(92%)	15(88%)	NS
Anti-Protrombina IgG	6(43%)	7(41%)	NS
Anti-Protrombina IgM	Ninguno (+)	Ninguno (+)	NS
Anti-β2GP-I- isotipo	9(64%)	11(65%)	NS
Anti-β2GP-I-IgA	6(43%)	7(41%)	NS
Anti-β2GP-I-IgM	8(57%)	7(41%)	NS
Anti-aCL-IgG	8(57%)	9(53%)	NS
Anti-aCL-IgM	7(56%)	8(47%)	NS
Anti-ac. Fosfatídico IgG	13(76.5%)	12(85.7%)	NS
Anti-Fosfatidilserina IgG	9(52.9%)	10(71.4%)	NS
Anti-Fosfatidilinositol IgG	16(94.1%)	12(85.7%)	NS

Tabla 7. Ac aFL/cofactores positivos entre pacientes con SaF. NS = no significativo.

7.1.8 Manifestaciones clínicas en pacientes con SaFP y SaFS.

En la tabla 8 se muestran las manifestaciones observadas y la frecuencia por grupo de pacientes. Los eventos vasculares cerebrales tuvieron una frecuencia de 58.8% en pacientes con SaFP y de 14.3% en pacientes con SaFS ($p=0.024$) y la linfopenia de 71.4% y 29.4% ($p=0.032$) respectivamente. No hubo diferencias con las otras manifestaciones clínicas.

MANIFESTACIONES CLINICAS	SaFP (n=17)	SaFS (n=14)	Valor P
Migraña	7(41%)	3(21%)	NS
Pseudomotor Cerebro	1(6%)	1(7%)	NS
Corea	3(18%)	1(7%)	NS
Crisis Convulsivas	3(18%)	1(7%)	NS
Ataque Isquemico Transitorio	1(6%)	1(7%)	NS
Evento Vascular Cerebral	10(59%)	2(14%)	0.024
Amaurosis Fugax	2(12%)	3(21%)	NS
Trombosis Arterial	2(12%)	2(14%)	NS
Trombosis Venosa Profunda	5(29%)	8(57%)	NS
Trombosis Venosa Superficial	2(12%)	2(14%)	NS
Trombo Embolia Pulmonar	4(24%)	4(29%)	NS
Hipertensión Arterial Pulmonar	5(29%)	2(14%)	NS
Infarto Agudo Miocardio	3(18%)	NPS	NS
Microangiopatía Trombótica (renal)	2(12%)	2(14%)	NS
Abortos	7(41%)	5(36)	NS
Preeclampsia	4(24%)	NPS	NS
Eclampsia	1(6%)	1(7%)	NS
Livedo reticularis	4(24%)	5(36%)	NS
Fenómeno de Raynaud	2(12%)	5(36%)	NS
Complejo vasculo-cutáneo	2(12%)	1(7%)	NS
Linfopenia	5(29%)	10(71%)	0.032
Trombocitopenia	8(47%)	6(43%)	NS
Leucopenia	1(6%)	1(7%)	NS
Anemia hemolítica Autoinmune	Ninguno	2(14%)	NS

NS = no significativo. NSP= no presentan síntomas

Tabla 8. Manifestaciones del SaF.

7.1.9 Correlación entre anticuerpos aFL/cofactores y manifestaciones clínicas en pacientes con SaF.

El análisis de correlación de las manifestaciones clínicas con la presencia de anticuerpos aFL/cofactor mostró que todos los pacientes con crisis convulsivas (4/4) tuvieron títulos altos de anticuerpos aAN-V de isotipo G ($p=0.01$ tabla 9). Los cuatro pacientes con trombosis venosa superficial (100%; $p=0.04$), los cuatro con microangiopatía trombótica (4/4, $p=0.04$) y el 85.7 % de los pacientes con fenómeno de Raynaud (6/7, $p=0.03$) tuvieron títulos altos de a β 2GP-I isotipo M, ver tabla 10.

El 78.6% de los pacientes con trombocitopenia (11/14) tuvieron títulos altos de aCL de isotipo G ($p=0.02$). 100% de los pacientes con corea (4/4) tuvieron anticuerpos aCL isotipo M positivos ($p=0.04$) tabla 11.

El 100% de los pacientes con complejo vasculo-cutáneo (3/3) tuvieron títulos altos de aPT isotipo G ($p=0.06$). Así como el 71.4% de pacientes con hipertensión arterial pulmonar (7/5, $p=0.09$) tabla 12.

El 50% de las pacientes que tuvieron abortos (6/12) tuvieron títulos altos de aFTS isotipo G ($p=0.07$) tabla 13.

El 50% de los pacientes que tuvieron anemia hemolítica (1/2) tuvieron títulos altos de aFTI isotipo IgG ($p=0.05$) tabla 14.

El 93.3% de pacientes con linfopenia (14/15) tuvieron títulos altos de aAF isotipo G ($p=0.08$) tabla 15.

MANIFESTACIONES	aAN-V IgG (n=7)	Valor P
Crisis Convulsivas (n=4)	4	0.001
Amaurosis Fugax (n=5)	3	0.06

Tabla 9. Manifestaciones clínicas y títulos altos de aAN-V.

MANIFESTACIONES	aβ2GPI-IgM n=15	Valor P
TVS n=4	4	0.04
MAT n=4	4	0.04
FR n=7	6	0.03

Tabla 10. Manifestaciones clínicas y títulos altos de aβ2GP-I isotipo M.

TVS = trombosis venosa profunda; MAT = microangiopatía trombótica renal; FR = fenómeno de Raynaud.

MANIFESTACIONES	aCI- IgG n=17	Valor P	aCI- IgM n=15	Valor P
Aborto n=12	4	0.07	6	NS
Trombocitopenia n=14	11	0.02	5	NS
Corea (n=4)	1	NS	4	0.04

NS = No significativo.

Tabla 11. Manifestaciones clínicas y títulos altos de aCL isotipos G y M

MANIFESTACIONES	aPt- IgG n=13	Valor P
HAP n=7	5	0.09
C. Vasculo-Cutáneo n=3	3	0.06

HAP = hipertensión arterial pulmonar.

Tabla 12. Manifestaciones clínicas y títulos altos de aPT isotipo G

MANIFESTACIONES	aFTI- IgG n=28	Valor P
Anemia hemolítica n=2	1	0.05

Tabla 13. Manifestaciones clínicas y títulos altos de aFTI isotipo G

MANIFESTACIONES	aFTS- IgG n=19	Valor P
Abortos n=12	6	0.079

Tabla 14. Manifestaciones clínicas y títulos altos de aFTS isotipo G

MANIFESTACIONES	aAF- IgG n=25	Valor P
Linfopenia n=15	14	0.089

Tabla 15. Manifestaciones clínicas y títulos altos de aAF isotipo G

Tomando en consideración las manifestaciones clínicas del SaF y las pruebas de laboratorio, la mayor prevalencia de anticuerpos anti-fosfolípidos/cofactores fueron: anti-complejo aCL/ β 2GP-I IgM y aFTI isotipo G (28/31), a β 2GP-I de isotipo G (20/31), aCL/ β 2GP-I isotipo A y aFTS isotipo G (19/31), aAF isotipo G (25/31), trombosis venosa profunda (13/31), evento vascular cerebral (12/31), abortos (12/31), migraña (10/31), linfopenia (15/31) y trombocitopenia (14/31).

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, analizamos la prevalencia y características más revelantes de la presentación clínica e inmunológica de un grupo de pacientes con SaF basados en los criterios de Sapporo⁴⁴ y de Alarcón Segovia¹⁵.

También confirmamos la prevalencia de SaF en mujeres tanto en su variedad primaria como asociado a LEG, con intervalo de edad entre los 20 y 50 años.

Con el desarrollo del presente trabajo se establecieron los valores de referencia de los anticuerpos anti-fosfolípido/cofactores obtenidos de nuestra población mexicana demostrando que tenemos una diferencia de valores a los de la población anglosajona.

En México existen pocos grupos dedicados al estudio del SaF donde, sin embargo, existen múltiples grupos de reumatólogos que tratan grupos de pacientes con el síndrome y que utilizan los valores normales de anticuerpos anti-fosfolípidos establecidos en poblaciones caucásica, asiática y negra. En cuanto a los anticuerpos aAN-V a pesar de su asociación no tan reciente con fenómenos trombóticos en especial en pacientes con SaF y abortos, no se habían incluido en el estudio de los pacientes con SaF. Lo observado en nuestra serie sugieren que los anticuerpos aAN-V de isotipo IgG además de generar alteraciones obstétricas como lo muestran otros autores⁵⁵, participan en el daño al sistema nervioso central, esto se podría explicar por la interacción de la anexina V con fosfolípidos cerebrales, dado su papel dentro de la apoptosis podría considerarse como marcador de actividad de la enfermedad sin expresión clínica a éste nivel.

La presencia de aAN-V isotipo IgG en nuestros pacientes con SaFS fue similar a la descrita por Matsuda⁵⁶ *et al* quien reportó una prevalencia del 26% y Kaburaki⁵⁷ *et al* reportaron un 19 %. Nuestros resultados muestran una prevalencia del 21%; todo esto coincide con Lockwood y Rand que demostraron que los aAF de clase IgG reducían los niveles de anexina V, concluyendo que esta reducción podría ser un mecanismo importante de trombosis y pérdida fetal en el SaF⁵⁸⁻⁵⁹. El trabajo de Roldán⁷² *et al* explora esta vía en pacientes jóvenes con antecedentes de infarto agudo de miocardio. Aunque sólo se detectan anticuerpos antifosfolipídicos en un escaso porcentaje de individuos, es muy probable que el hecho de que los valores de anexina V sean inferiores en el grupo de pacientes favorezca la aparición de trombosis coronaria oclusiva si, además, tienen arteriosclerosis coronaria, al inhibirse la formación de trombina en una proporción menor de la normal. Unos valores inferiores de esta glucoproteína circulante favorecerían posiblemente una trombosis aguda más exuberante y obstructiva que la que se formaría en presencia de concentraciones normales, cumpliendo el requisito teórico de favorecer la formación de un trombo más grande ante un mismo estímulo, es decir, ante una misma lesión de la pared coronaria.

En pacientes que presentaron títulos altos de aANV se observó asociación con crisis convulsivas y amaurosis fugax, siendo estas significativas.

Los títulos de los autoanticuerpos aAN-V de isotipo IgM fueron normales tanto para SaFP como SaFS.

El establecimiento de los puntos de corte de los autoanticuerpos permitió observar la prevalencia de la gran variedad de manifestaciones clínicas de los pacientes con SaFP y/o asociado a LEG ya descritas por otros autores⁶⁰. En nuestra serie de 31 pacientes mexicanos observamos una asociación significativa con la presencia de eventos vasculares cerebrales, con una frecuencia mayor en pacientes con SaFP y linfopenia en pacientes con SaFS lo cual se podría atribuir a la entidad inmunológica asociada.

Dentro de las manifestaciones trombóticas, la trombosis venosa profunda fue la más frecuente al igual que en otras series reportadas^{10,61-65}.

De las manifestaciones obstétricas encontradas, la pérdida fetal fue la más frecuente 38.7% (12/31). La trombocitopenia y la linfopenia fueron las manifestaciones hematológicas más frecuentes 45.1% y 48.3% respectivamente en pacientes con SaF. En diversas publicaciones la trombocitopenia va de leve a moderada^{10,61-64}, nuestros resultados son similares al grupo de Vargas-Grajales⁶⁶ *et al* en donde obtuvieron 46.7 % de casos con trombocitopenia.

Las manifestaciones neurológicas del SaF se asocian principalmente a eventos oclusivos trombóticos⁶⁷. La manifestación más frecuente observada en nuestra serie fue la cerebro-vascular con una prevalencia del 38.7% y migraña con una prevalencia del 32.2%, predominando en pacientes con SaFP.

La presentación inmunológica encontrada fue similar a la reportada en otros estudios. Los anticuerpos anti-fosfolípidos más frecuentes fueron: anticuerpos anti-complejo CL/β2GPI isotipos IgM 90.3% (28/31) e IgA 61.3% (19/31).

Del mismo modo se ha descrito en la literatura que el isotipo de los aFL/cofactores (aCL y a β 2GPI) que se relaciona con mayor frecuencia a las manifestaciones clínicas del SaF en especial con eventos trombóticos es el IgG, sin embargo, nosotros encontramos en nuestro estudio una mayor prevalencia del isotipo IgM aCL /a β 2GPI .

Un dato importante es la correlación entre a β 2GPI isotipo IgM con trombosis venosa superficial como lo sugieren otros autores⁶⁸⁻⁷¹, microangiopatía trombótica a nivel renal y fenómeno de Raynaud en pacientes con SaFP. Este hecho apoya la noción de que uno de los principales aFL/cofactor son los anti- β ₂GP-I con lo que su detección en el laboratorio se hace cada vez más necesaria para el diagnóstico del SaF.

Nuestro estudio confirma que la determinación de anticuerpos aPT no es de gran utilidad para detectar a los pacientes con riesgo de trombosis como lo sugieren algunos autores⁵⁴.

CONCLUSIONES

- Con el establecimiento de valores de referencia en la población mexicana demostramos que existe gran diferencia en los puntos de corte entre poblaciones.
- El establecimiento de los puntos de corte en la población mexicana ayudará a tener un manejo adecuado de los pacientes con SaF.
- Los resultados mostrados revelan la prevalencia del sexo femenino tanto para pacientes con SaFP y SaFS.
- La prevalencia de aAN-V es muy baja en los pacientes mexicanos con SaF primario y/o asociado a LEG.
- La presencia de anticuerpos aAN-V en pacientes con SaF se asocia con la presencia de eventos trombóticos y abortos 38.7%; más sin embargo, la presencia de títulos altos en pacientes se asoció a manifestaciones como amaurosis fugax y crisis convulsiva.
- La presencia de títulos altos de a β 2GPI de isotipo IgM en pacientes con SaF se asoció a trombosis venosa superficial, microangiopatía trombótica y fenómeno de Raynaud.
- Títulos altos de aCL isotipo IgG se asociaron con trombocitopenia y los de aCL isotipo IgM con corea en pacientes con SaFP.
- Títulos altos de anticuerpos aFTS isotipo IgG se asociaron con abortos.
- Títulos altos de anticuerpos aFTI isotipo IgG se asociaron con linfopenia y anemia hemolítica.

- No se observaron diferencias en los títulos altos de autoanticuerpos entre pacientes con SaFP y SaFS.
- Se observó una alta prevalencia de eventos vasculares cerebrales, trombocitopenia, abortos y migraña en pacientes con SaFP; en tanto que en pacientes con SaFS se observó una mayor prevalencia de trombosis venosa profunda, linfopenia y trombocitopenia.
- Identificamos la prevalencia y características principales en las manifestaciones clínicas y de laboratorio en pacientes con SaFP y SaFS, lo cual confirma la heterogeneidad del síndrome.

Es necesario investigar más a fondo estos anticuerpos aFL/cofactores.

BIBLIOGRAFIA

1. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991; 49:193-280.
2. Krilis SA, Hunt JE. Immunology of antiphospholipid antibodies, In: Panayi GS, editor. *Immunology of connective tissue diseases* (Immunology and Medicine series). Boston: Kluwer Academic; 1993.p.279-304
3. Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* 1994;84:2854-67
4. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990; 112:682-98.
5. Cines DB, McCrae KR. The antiphospholipid-protein syndrome. *F Clin Immunol* 1995;15:86S-100S
6. Roubey RA. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1444-54
7. Shapiro SS. The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Annu Rev Med* 1996;47:553-53
8. Nahass GT. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid antibody syndrome. *F Am Acad Dermatol* 1997; 36(2Pt 1):149-68.
9. Harris EN, Hughes GRV and Gharavi AE. Antiphospholipid antibodies: an elderly statesman dons new garments. *J Rheumatol.* 1985; Supplement 12. 14:208-213.

10. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, Sanchez-Guerrero J, Gómez-Pacheco L, Cabiedes J, *et al.* Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: a prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68: 353-365
11. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón Segovia D. Clinical manifestation of the antiphospholipid syndrome in patient with systemic lupus Erythematosus associated more strongly with anti-B2-Glycoprotein I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995;22:1899-1906
12. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Antibodies to phospholipid free B2 glycoprotein I in patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1995;22:1894-1898
13. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO. Anti B2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995;89:397-402
14. McNally T, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. Increased level of B2-glycoprotein I antigen and B2-Glycoprotein binding antibodies are associated with thrombosis in patient with SLE and primary antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1995;34:1031-1036
15. Sanchez-Guerrero J., Delezé M., Alarcón- Segovia D. Síndrome de anti-fosfolípidos primario. XI Congreso Mexicano de Reumatología. Puebla, 1988.
16. Branch DW: Antiphospholipid syndrome: Laboratory concerns, fetal loss, and pregnancy management. *Sem Perinat* 1991; 15:230-237

17. Wilson W.A., Gharavi AE, Koike T., et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1309-1311
18. Wasserman A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische Reaction bei Syphilis. *Deutsch Med Wöchenschr* 1906;32:747
19. Pengborn MC. New serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med (NY)*. 1941; 48:484-486.
20. Moore JE and Mohr CF. Biologically false positive serologic test for syphilis: type, incidence and case. *J Am Med Assn.*1952; 150:467-473.
21. Nelson RA and Mayer MM. Immobilization of *Treponema pallidum in vitro* by antibody produced in syphilitic infection. *J Exp Med.* 1949; 89:369.
22. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1983; 2:1211-1214.
23. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, et al. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol.* 1985 Dec;62(3):738-45.
24. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker H C, DE Baets MH, Van Breda-Vriesman PJ V et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335:1544-7
25. Mcneil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of

- coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). PROC Natl Acad Sci USA 1990; 87:4120-4
26. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet 1990; 336:177-8
27. Rand JH. <<Antinuclear pathologies>> a new class of diseases. N Engl J Med 1999;340:1035-6
28. Roberts D., Schwartz RS: Clotting and hemorrhage in the placenta, A delicate balance. N Engl J Med 2002;347(1) Review
29. Bevers EM, *et al.* Regulatory mechanism of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. Lupus 1998;7(suppl.2):5126-5131
30. Shick PK, *et al.* Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. J Clin Invest 1221-1226
31. Bertolaccini ML., *et al.* Antibodies to human prothrombin and clinical manifestation in 207 patients with SLE. J.Rheumatol 1998;25:11104-11108
32. Triplett DA., Antiphospholipid protein antibodies: laboratory detection and clinical relevance, Thromb Res, 1995; 78:1-31
33. Muñoz RFJ., Reverter JC., Cervera R, Font J: Autoanticuerpos en el síndrome antifosfolipídico. In: Font J, Garcia-Carrasco M. Ramos Casals M, Cervera R, Ingelmo MM, (ed) Autoanticuerpos en la práctica clínica. Masson: Barcelona;2001:147-156

34. Bowie EJW, Thomson JH, Pascuzzi CA, *et al.* Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Clin Invest.* 1963; 62:416-430.
35. Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ. Peripheral vascular syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med.* 1965; 62:907-919.
36. Nilsson IM, Astedt B, Heder H, Berezin D. Intrauterine death and circulating anticoagulant ('antithromboplastine'). *Acta Med Scan.* 1975; 197:153-159.
37. Soulier JP, Bofia MC. Avortements a repetition, thromboses et coagulant circulant anti-thromboplastine. *Novelle Press Médicale.* 1980; 9:859-864.
38. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol.* 1986; 13:486-489.
39. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, *et al.* Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1983; 2:1211-1214.
40. Koike T, Sueishi M, Funkai H, Tomioka H, Yoshida S. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1984; 56:193-199.
41. Lockshin MD, Druzin ML, Goei S, Qamar T, Magid MS, Jovanovic L, Ferenc M. Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1985; 313:152-156.
42. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, Sánchez-Guerrero J, Gómez-Pacheco L, Cabiedes J, Fernández L, Ponce de León S. Antiphospholipid antibodies and the

- antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine*. 1989, 68:353-365.
43. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa A, Drenkard C and Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Sem Arth Rheum*. 1992; 21:275-286.
44. Wilson WA, Gharavi AE, Koite T, Lockshin MD, Branco DW, Piette J-C, *et al* . International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311
45. Lockshin M., Sammaritano L.R., and Schwartzman S. Validation of Sapporo Criteria for antiphospholipid syndrome. *Arthr and Reum* 2000:43(2):440-443
46. Drenkard C, Vila AR, Reyes E, Abello M, Alarcón-Segovia D. Vasculitis in systemic lupus Erythematosus. *Lupus*.1997;6:235-242
47. Alarcón-Segovia D, Cabral AR. The anti-phospholipid antibody syndrome: clinical and serological aspects. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2000; **14**:139-150.
48. Rand JH, Wu X, Andree HAM, Ross JBA, Rusinova E, Gascon-Lema MG, *et al*. Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting Annexin-V binding to phospholipids: a <<lupus procoagulant>> phenomenon. *Blood* 1998;5:1625-60
49. Reutelingsperger CPM. Annexins: key regulators of haemostasis, thrombosis and apoptosis. *Tromb Haemost* 2001;86:413-9.

50. Van Heerde WL, De Groot Pg, Reutelingsperger CPM. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost* 1995;73:1279
51. Rand JH. <<Annexinopathies>> a new class of diseases. *N Engl J Med* 1999;340:1035-6
52. Rand JH, Wu X. Antibody-mediated disruption of the Annexin-V antithrombotic shield: a new mechanism for thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1999;82:649-55
53. Rand JH. The pathogenic role of Annexin-V in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheum Reports* 2000;2:246-251
54. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993;342:341-4
55. Ogawa H, Zhao D, Dlott JS, *et al*; "Elevated anti-Annexin V antibody levels in antiphospholipid syndrome and their involvement in antiphospholipid antibody specificities. *Am J Clin Pathol* 2000;114:619-628
56. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Gotoh M, Tsukamoto M: Anti-Annexin V antibody in systemic lupus Erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. *Am J Hematol* 47:56,1994
57. Kaburaki J, Kuwana M, Yamamoto M, Kawai S, Ikeda Y. Clinical significance of Anti-annexin V antibodies in patients with systemic Lupus Erythematosus. *Am J Hematol* 54:209-213 (1997)
58. Rand JH. *et al*. Pregnancy loss in the antiphospholipid syndrome. A possible thrombogenic mechanism. *N. Engl J. Med* 1997: 337(3)154-160

59. Lockwood CJ, Rand JH: The immunobiology and obstetrical consequences of antiphospholipid antibodies. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49:432-441
60. Levine J, Branch W, Rauch J, The Antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346: 752-763
61. Asherson RA, Kamastha MA, Ordi-Ros J. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68: 366-372
62. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342: 341-344.
63. Asherson RA, Cervera R. "Primary", secondary and other variants of the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1994; 3: 293-298
64. Cervera R, Jean Charles P, Font J, Khamastha M, Shoenfeld Y, Camps M, *et al.* Antiphospholipid syndrome. Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002; 4: 1019-1027
65. Soltesz P, Veres K, Lakos G, Muszbeck L, Szagedi G. Evaluation of clinical and Laboratory features of antiphospholipid syndrome: a retrospective study of 637 patients. *Lupus* 2003; 12: 302-307
66. Vargas Grajales F, Pinto Peñaranda LF, Molina Restrepo JF *et al.* Antiphospholipid syndrome: morbidity and evolution of cohort of patients of Hospital Pablo Tobon Uribe of Medellín-Colombia. *Rev Colomb. Reumatol.* 2006; 13: 109-119

67. Tanne D, Hassin-Baer S. Neurologic manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Current Rheumatology Reports* 2001;3: 286-296
68. Cadavid J.A., García O.G., Álvarez P.M, *et al.* Determination of antibody a β 2GPI in patients with antiphospholipid syndrome. *Rev Med* 2004;17:328-338
69. Guerin J, Feighery C, Sim RB, Jackson J, Antibodies to a- β 2GPI specific marker for the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol* 1997;109:304-309
70. Martinuzzo ME, Forasteiro RR, Carreras LO. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995;89:397-402
71. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Koike T, Hughes GRV. Specificity of ELISA for antibody to β 2GPI in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1996;35:1239-1243
72. Roldan V, Marín F, Pineda J, Marco P, Corral J, Climent B, *et al.* Annexin V in patients surviving a premature myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:1230-4.