



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**EL PAPEL DE LA GLICOSILACIÓN EN LA B₂GLICOPROTEÍNA-I
(B₂GP-I) EN EL RECONOCIMIENTO POR LOS ANTI-B₂GP-I (αB₂GP-I)
Y SU PARTICIPACIÓN EN LA ACTIVACIÓN CELULAR**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

M EN CB. DIEGO FRANCISCO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

**TUTOR PRINCIPAL: DR. LUIS LLORENTE PETERS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. BLANCA HAYDE RUÍZ ORDAZ,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,
UNAM**

MÉXICO, D.F. MARZO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**“Después de escalar
Una montaña muy alta,
Descubrimos que hay muchas
Otras montañas por escalar”**

Nelson Mandela

Gracias al Posgrado en Ciencias Biomédicas, por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme continuar con mi desarrollo profesional a lo largo de un gran camino en mi educación y sobre todo darme la oportunidad de estudiar en una gran institución.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que permitió continuar con mis estudios de posgrado.

Gracias a mi Tutor

Al Dr. Javier Cabiedes Contreras, Por todas sus enseñanzas, por todo su apoyo, por ser más que un maestro y sobre todo por ser un gran amigo, lo recordare siempre.

Al Dr. Luis Llorente Peter, por todo su apoyo, por sus enseñanzas y sobre todo permitirme continuar mis estudios bajo su tutela.

A la Dra. Yolanda López Vidal, por sus enseñanzas, consejos y por el apoyo brindado a lo largo de mis estudios.

A la Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz, por todo el apoyo brindado y a sus comentarios adecuados, que me permitieron llevar a buen término la tesis.

Al Dr. Antonio Cabral Castañeda, por todo su apoyo incondicional, por todas sus enseñanzas, por su confianza, por ser un gran amigo y que continuemos colaborando juntos.

A mis padres, por su apoyo y comprensión a lo largo del trayecto que es la vida.

A mi hermana Claudia, por todos los momentos felices que pasamos y por aguantarme demasiado.

A mis hermanos, por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A Carlos, por ser un gran compañero, un gran amigo y ahora un gran compañero.

A Elizabeth, por su gran e incondicional apoyo y los gratos momentos que hemos pasado juntos.

A Araceli, Tere y Martha por ser grandes amigas y compañeras.

Al Departamento de Inmunología y Reumatología, por permitirme realizar mis estudios de posgrado y permitirme trabajar en esta gran institución.

Abstract

Several studies have shown that conformational changes of β_2 glycoprotein-I (β_2 GPI) when bound to negatively charged components expose cryptic epitopes and promote subsequent binding of anti- β_2 GPI from patients with antiphospholipid syndrome (APS). However, the role of the carbohydrate chains of β_2 GPI in this anti- β_2 GPI reactivity is poorly understood.

We therefore studied the reactivity and inhibition of anti- β_2 GPI antibodies from APS patients with native, partially deglycosylated β_2 GPI (dp β_2 GPI; without sialic acid) and completely deglycosylated β_2 GPI (dc β_2 GPI). To determine the potential biologic importance of these glycoforms and their interaction with anti- β_2 GPI *in vitro*, stimulation assays were performed with the U937 cell line.

We found an increased reactivity of anti- β_2 GPI against dp β_2 GPI and dc β_2 GPI compared to native β_2 GPI. Both deglycosylated β_2 GPI isoforms showed higher inhibition of the anti- β_2 GPI reactivity than the native protein in soluble-phase. Likewise, the antibody-glycoform complexes increased the synthesis of IL-6, IFN γ and TNF α and the expression of HLA-DR, CD14 and CD11c in U937 cells.

Our work suggests that the partial or complete removal of the carbohydrate chains uncover cryptic epitopes present in β_2 GPI. The differentiation and increased synthesis of pro-inflammatory cytokines by U937 cells *in vitro* may have pathogenic implications.

Resumen

Diversos estudios han demostrado un cambio conformacional de la β_2 glicoproteína-I (β_2 GPI) cuando se une a componentes de carga negativa, permitiendo una subsecuente unión de anticuerpos anti- β_2 GPI en pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SaF). Sin embargo, el papel de la cadena de carbohidratos de la β_2 GPI en la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI es desconocido.

Para determinar su papel, realizamos estudios de reactividad e inhibición de anticuerpos anti- β_2 GPI de pacientes con SaF con β_2 GPI nativa, parcialmente desglicosilada (pd β_2 GPI; sin ácido siálico) y completamente desglicosilada (cd β_2 GPI). Para determinar la importancia biológica de estas glicoformas y su interacción con la anti- β_2 GPI, estimulamos células U937.

Encontramos un incremento en la reactividad de anticuerpos anti- β_2 GPI contra pd β_2 GPI y cd β_2 GPI comparada con la reactividad contra β_2 GPI nativa. Además, ambas glicoformas presentan un incremento en la inhibición de los anticuerpos anti- β_2 GPI comparada con la β_2 GPI nativa en fase soluble. Por otro lado, el complejo anticuerpo-glicoformas incrementa la síntesis de IL-6, IFN γ y TNF α , además de la expresión de HLA-DR, CD14 y CD11c en Células U937.

Nuestro trabajo sugiere que la remoción parcial o total de los carbohidratos permite la exposición de epítomos críticos presentes en la β_2 GPI y la diferenciación e incremento en la síntesis de citosinas pro-inflamatorias por las células U937 *in vitro* pueden tener un papel patogénico.

Índice general

	Página
1. Generalidades	15
1.1 Historia	15
1.2 Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SaF)	16
1.3 Anticuerpos antifosfolípidos (aFL)	17
1.4 Mecanismo patogénicos de los aFL	19
1.5 Anticoagulante lúpico (AL)	21
1.6 Anticuerpos anticardiolípina (aCL)	16
1.7 β_2 -glicoproteína I	24
1.8 Anticuerpos anti- β_2 GPI	29
2. Justificación del proyecto	34
3. Hipótesis	34
4. Objetivos	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos particulares	35
5. Metodología	36
5.1 Pacientes	36
5.2 Purificación de la β_2 GPI	36
5.3 Purificación de anticuerpos de isotipo IgG	37
5.4 Generación de las glicoformas de la β_2 GPI	38
5.4.1 Desglicosilación completa de la β_2 GPI (dc β_2 GPI)	38

5.4.2	Desglicosilación parcial de la β_2 GPI (dp β_2 GPI; remoción del ácido siálico)	38
5.5	Medición por espectrometría de las glicoformas de la β_2 GPI	39
5.6	Reactividad de los anticuerpos IgG contra β_2 GPI y cardiolipina (CL)	39
5.7	Reactividad contra las glicoformas de la β_2 GPI y el complejo CL-glicoformas	40
5.7.1	Reactividad contra las glicoformas de la β_2 GPI	40
5.7.2	Reactividad contra el complejo CL-glicoformas de la β_2 GPI	41
5.7.3	Curva dosis-respuesta	41
5.8	Ensayos de inhibición contra las glicoformas de la β_2 GPI	41
5.9	Marcadores de diferenciación celular y medición de citocinas de cultivos de células U937 estimulados con los complejos anticuerpos-glicoformas	42
5.9.1	Cultivos celulares	42
5.9.2	Medición de citocinas	43
5.9.3	Citometría de flujo de las células U937	44
5.10	Análisis estadístico	44
6.	Resultados	45
6.1	Pacientes	45
6.2	Desglicosilación parcial y total de la β_2 GPI	45
6.3	Caracterización espectroscópica de las glicoformas de la β_2 GPI	47

6.4	Reactividad de anticuerpos IgG purificados contra las glicoformas de la β_2 GPI y el complejo CL-glicoformas de la β_2 GPI	47
6.5	Inhibición de los anticuerpos IgG en fase líquida con las glicoformas de la β_2 GPI	51
6.6	Expresión de marcadores de diferenciación en células U937 inducidas por los complejos anticuerpos IgG-glicoformas	51
6.7	Síntesis de citocinas pro-inflamatorias por las U937 inducida por los complejos anticuerpos IgG-glicoformas.	54
7.	Discusión	56
8.	Conclusiones	59
9.	Bibliografía	60

Índice de tablas

Tabla		Pag.
1.	Criterios de clasificación de Sydney para el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos	18
2.	Mecanismos de trombosis mediados por los aFL en el SaF	20

Índice Figuras

Figura		Pagina
1.	Detección del AL	23
2.	Estructura conformacional de la β_2 GPI	25
3.	Modelo del cambio conformación de la β_2 GPI	26
4.	Participación de la β_2 GPI en la cascada de coagulación y mecanismos fibrinolíticos	28
5.	Activación de células endoteliales vía complejo aFL- β_2 GPI	32
6.	Activación plaquetaria vía complejo aFL- β_2 GPI	33
7.	Reactividad de los sueros contra aCL y β_2 GPI	46
8.	Electroforesis de las glicofomas de la β_2 GPI en SDS-PAGE	46
9.	Propiedades espectroscópicas de las glicofomas de la β_2 GPI	48
10.	Reactividad de anticuerpos IgG purificados contra las glicofomas de la β_2 GPI	49
11.	Reactividad de los anticuerpos IgG purificados contra los complejos CL-glicofomas de la β_2 GPI	50
12.	Curva dosis-respuesta de anticuerpos IgG purificados contra las glicofomas de la β_2 GPI.	50
15.	Ensayos de inhibición	52
16.	Expresión de marcadores de superficie en células U937	53
17.	Expresión de citocinas en sobrenadante de cultivos U937	55

Abreviaturas

β_2 GPI	β_2 -Glicoproteína I
aCL	Anticuerpo anticardiolípina
aFL	Anticuerpos antifosfolípidos
AL	Anticoagulante lúpico
ApoER2	Receptor de Apolipoproteína E2
APt	Activador de plasminógeno tisular
ASB	Albúmina sérica bovina
CCP	<i>Complement control protein</i> (Proteínas reguladoras del complemento)
DC	Dicroísmo circular
CD11c	<i>Cluster of Differentiation 11c</i>
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
CD40	<i>Cluster of Differentiation 40</i>
CL	Cardiolipina
CL- β_2 GPI	Cardiolipina- β_2 GPI
CO ₂	Dióxido de carbono
dc β_2 GPI	β_2 GPI desglucosilación completa
DO	Densidades ópticas
dp β_2 GPI	β_2 GPI desglucosilación parcial
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FII	Factor II
FT	Factor tisular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTC	Fosfatidilcolina
FTE	Fosfatidiletanolamina
FTI	Fosfatidilinositol
FTS	Fosfatidilserina

FTS-PT	Fosfatidilserina-protrombina
FVII	Factor VII
FVII	Factor VII activado
FVIII	Factor VIII
FX	Factor X
FXI	Factor XI
FXII	Factor XII
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigens-DR</i>
HMWK	<i>High Molecular Weight Kininogen</i> (Cinínogénos de alto peso molecular)
HRP	Peroxidasa de raíz fuerte
IFAT	Inhibidor de fibrinólisis estimulada por trombina
IFN γ	Interferon- γ
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
kDa	KiloDalton
LEG	Lupus Eritematoso Generalizado
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
N $_2$	Nitrógeno
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer activated B cell</i>
OD	Densidad óptica
PB	Amortiguador de fosfatos
PBS	Amortiguador de fosfatos-Salino
PBS-A	Amortiguador de fosfato-salino-Albúmina sérica bovina
PBS-T	Amortiguador de fosfato-salino-Tween 20

PCaPS	Proteína C activada por proteína S
PE	Ficoeritrina
PMA	Forbol-Miristato-Acetato
PT	Protrombina
SaF	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos
SaFP	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario
SaFS	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario
SBF	Suero bóvino fetal
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
SEM	Error estándar medio
SS	Sujeto sano
TKC	Tiempo de coagulación por Caolín
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMB	3,3',5',5' Tetrametil-bencidina
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
TP	Tiempo de protrombina
TTPa	Tiempo de tromboplastina parcial activada
TVVR	Tiempo de veneno de víbora Russell
UA	Unidades arbitrarias
UGPL	<i>IgG antiphospholipid unit</i> (unidades de inmunoglobulinas IgG de anticuerpos antifosfolípidos)
VDRL	<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>

1. Introducción

1.1 Historia

Los primeros estudios relacionados con la presencia de los anticuerpos antifosfolípidos (aFL) se realizaron en 1906, cuando *Wasserman et al.* identificaron sueros de pacientes con sífilis que reaccionaban contra los extractos de tejido de pacientes con la misma enfermedad. Esta reacción inicialmente se le atribuyó a la presencia de anticuerpos dirigidos contra epítomos derivados del *Treponema pallidum* y se le denominó “prueba de reagina de *Wassermann*”. Aunque, estudios posteriores encontraron resultados similares utilizando tejido de sujetos sanos y animales¹. Fue hasta 1941, cuando *Pangborn* aísla por primera vez uno de los componentes principales de la prueba de reagina a partir de corazón de ternera. El componente aislado fue la cardiolípidina (difosfatidilglicerol; CL), la cual junto con la lecitina y el colesterol forman la base actual de la prueba para la detección de reagina en pacientes con sífilis, a este estudio se le conoce como *VDRL* (acrónimo del idioma inglés *Veneral Disease Research Laboratory*)^{1,2}.

En 1952, *Moore* y *Mohr* identificaron que en algunas circunstancias la prueba de *VDRL* puede dar falsos positivos, como en ciertas infecciones virales agudas, en vacunación con partículas virales y en respuestas autoinmunes². Por otro lado, en ese mismo año, *Conley* y *Hartman* reportaron dos casos de pacientes que presentaban desordenes hemorrágicos con TTPa prolongados y además daban *VDRL* falso positivo. A este fenómeno posteriormente se le denominó “anticoagulante lúpico” (AL). Siendo su efecto principal la prolongación en los

tiempos de coagulación en las pruebas dependientes de fosfolípidos *in vitro* y además puede dar falsos positivos en pacientes que no padecen de sífilis^{3,4}.

Posteriormente en 1983 *Harris et al.* describen la técnica del radioinmunoensayo, que permitió la detección de los anticuerpos anti-CL (aCL) y cinco años más tarde, ellos mismo estandarizaron el “ELISA” (acrónimo del idioma inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)^{5,6}. Fue entre los años de 1983 al 1985, cuando *Hughes* publica una serie de artículos describiendo la asociación de distintas manifestaciones clínicas con la presencia de anticuerpos aCL. A esta entidad clínica se le denominó posteriormente “síndrome de anticuerpos antifosfolípidos” o “síndrome de *Hughes*”⁷. En 1989 *Alarcón-Segovia y Sánchez-Guerrero* publican por primera vez los criterios de clasificación de pacientes que presentan manifestaciones clínicas y datos de laboratorio para el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SaF) y que no presentaran manifestaciones clínicas de otras enfermedades autoinmunes, principalmente Lupus Eritematoso Generalizado (LEG); a esta entidad clínica se le denominó como “síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario” (SaFP) para así poderla diferenciar del “Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario” (SaFS) donde se presentan las manifestaciones del SaF, con signos y síntomas de otras enfermedades autoinmunes principalmente LEG⁸.

1.2 Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SaF).

El SaF es una enfermedad autoinmune multifactorial, que se caracteriza por la presencia de trombosis a nivel arterial y/o venoso. Además, en mujeres se

presentan abortos recurrentes asociados a la presencia de títulos altos de anticuerpos antifosfolípidos^{1,9}. La oclusión de arterias y/o venas afecta a distintos órganos con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, entre las que se encuentran: alteraciones neuronales, cardíacas, renales, hematológicas endocrinas, gastrointestinales, pulmonares, dermatológicas, obstétricas y vasculares aunque, únicamente la trombosis y los abortos recurrentes están consideradas en los criterios de clasificación de *Sydney* para el SaF^{10,11} (tabla 1).

1.3 Anticuerpos antifosfolípidos (aFL)

Inicialmente, se definieron los aFL como anticuerpos dirigidos contra la CL. Pero, actualmente, se denomina aFL a un grupo heterogéneo de anticuerpos que van dirigidos no sólo contra FL, sino también contra proteínas plasmáticas que se unen a FL. Estos anticuerpos son detectados mediante dos pruebas distintas, una para la detección directa de los aFL en fase sólida (ELISA) y la otra para la detección indirecta con base en las pruebas de coagulación para la detección del AL (vg. tiempo de protrombina [TP], tiempo de tromboplastina parcial activada [TTPa] tiempo de coagulación por Caolín [TKC] y tiempo del veneno de víbora *Russell* [TVVR])¹².

Tabla 1. Criterios de clasificación de Sydney para el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos

Criterios Clínicos

Trombosis vascular

- ≥ 1 episodio clínico de trombosis arterial, venosa o de vasos pequeños, en algún órgano o tejido.
- Trombosis confirmada por estudios de imagen o histopatológico
- Trombosis presente sin evidencia de inflamación en la pared vascular

Morbilidad en el embarazo

- ≥ 1 muerte inexplicable de un feto normal morfológicamente o antes de las 10 semanas de gestación, con morfología del feto normal documentada por ultrasonido o por examen directo del feto
- ≥ 1 nacimiento prematuro de un neonato normal morfológicamente antes de las 34 semanas de gestación debido a eclampsia, preclamsia severa o características específicas de insuficiencia placentaria.
- ≥ 3 abortos espontáneos recurrentes inexplicables antes de la décima semana de gestación, con exclusión de anomalías anatómicas maternas, hormonales o cromosómicas

Criterios de laboratorio

Anticoagulante lúpico

- Presente en plasma en ≥ 2 ocasiones en < 12 semanas, detectado de acuerdo a los lineamiento de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (Subcomité científico sobre AL/anticuerpos dependientes de FL)

Anticuerpos anticardiolípina de isotipo IgG y/o IgM

- Presente en suero o plasma a títulos medios y altos (≥ 40 GPL o MPL o $>$ a la percentila 99) en > 2 ocasiones en < 12 semanas, medido por un ELISA estandarizado

Anticuerpos anti- β_2 GPI de isotipo IgG y/o IgM

- Presente en suero o plasma (título $>$ a la percentila 99), ≥ 2 ocasiones en < 12 semanas, medido por un ELISA estandarizado, de acuerdo a los procesos recomendados

*Se diagnóstica al paciente con SaF si hay ≥ 1 criterio clínico más 1 criterio de laboratorio. Tabla modificada de Miyakis *et al.*¹⁰

Actualmente se han descrito más de 40 posibles antígenos de los aFL presentes en plaquetas, endotelio vascular o en forma soluble en el torrente sanguíneo y se pueden clasificar en seis grupos, dependiendo de su estudio e importancia en el SaF los cuales denominan: a) Grupo 1, aquellos bien definidos y estudiados [β_2 GPI, protrombina, proteína C y S y anexina V]; b) Grupo 2, aquellos que son aceptados, pero poco estudiados [trombina, anexina 2, C4, factor H, cininógenos, calicreína, FVII/FVIIa y antitrombina]; c) Grupo 3. FL puros [CL, fosfatidilserina (FTS), fosfatidiletanolamina (FTE), fosfatidilinositol (FTI), fosfatidilcolina (FTC), CL oxidada y LDL oxidada]; d) Grupo 4, alguna veces relevantes [plasmina, factor tisular (FT), inhibidor del FT, factor activador de plaquetas y CD40/CD40L]; e) Grupo 5, asociados a aFL [CD36, trombomodulina y fosfolipasa A2]; f) Grupo 6, implícitos por definición [FVIII, FX, FXI y FXII]¹³ y otros antígenos que aún se desconoce su importancia en el SaF¹⁴.

1.4 Mecanismos patogénicos de los aFL

Los aFL pueden interactúan por dos mecanismos patofisiológicos distintos. En el primero, se alteran las reacciones hemostáticas que ocurren en las membranas de ciertas células (plaquetas y células endoteliales) y en el segundo se altera la cinética de coagulación-anticoagulación por reacción cruzada con proteínas de unión a membrana y por inhibición en la interacción de proteína-FL [Tabla 2]¹⁵.

Tabla 2. **Mecanismos de trombosis mediados por aFL en el SaF**

<i>1. Reacción de inhibición de anticoagulantes</i>	
1.1 Inhibición de la proteína C reactiva	a) Inhibición de la activación de la proteína C b) Inhibición de la proteína C activa
1.2 Inhibición de la actividad antiprotrombina	
1.3 Desplazamiento de la anexina V	
1.4 Inhibición de la actividad anticoagulante de la β_2 GP-I	
<hr/> <i>2. Eventos mediados por células</i>	
2.1 Monocitos	a) Expresión del factor tisular
2.2 Células endoteliales	a) Incremento en la actividad procoagulante de la células endoteliales 1) Expresión del factor tisular 2) Expresión de moléculas de adhesión b) Alteración de la fibrinólisis c) Desregulación de eicosanoides 1) Decremento en la producción de PGI_2 por parte de las células endoteliales
2.3 Plaquetas	a) Incremento en la producción de tromboxano A2

Tabla modificada de *Espinosa et al.*¹⁵

1.5 Anticoagulante lúpico (AL)

El AL es un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas de isotipos IgG, IgM e IgA que interfieren con las pruebas de coagulación *in vitro* dependientes de fosfolípidos TP, TTPa, TCK y TVVR [Figura 1]^{12,16}. Las primeras evidencias del AL fueron reportadas por *Conley y Hartmann*, que encontraron pacientes con LEG que presentaban TTPa prolongados y, originalmente, lo asociaron a desórdenes hemorrágicos³. Fue hasta 1972 cuando *Feinstein y Rapaport* introducen el nombre de “Anticoagulante Lúpico”¹⁷ y en 1975 *Nilsson et al.* describen la primera asociación del AL con abortos espontáneos recurrentes¹⁸.

Si bien, el fenómeno de AL se define en los ensayos *in vitro* con prolongación en los tiempos de coagulación, en los fenómenos *in vivo* se desarrolla un efecto procoagulante¹⁶, esto principalmente debido a la ausencia de la anexina V que cubre la superficie de la bicapa lipídica e inhibe la formación de los complejos procoagulantes, cuando no está presente la anexina V el complejo aFL- β_2 GPI puede prolongar los tiempos de coagulación, ya que se incrementa la afinidad de la β_2 GPI por las membranas celulares reduciendo la disponibilidad de los factores de coagulación. Por otro lado, los complejos también pueden favorecer el desplazamiento de la anexina V, incrementando la cantidad de fosfolípidos expuestos al medio e induciendo la cascada de coagulación¹⁹.

Antes de la identificación de la participación de la β_2 GPI en el AL, se reportaban algunos subtipos de AL de acuerdo con el comportamiento de inhibición del coágulo en TKC^{20,21} y fue hasta 1992 cuando *Oosting et al.* y *Roubey*

et al. demostraron que algunos AL dependen de la β_2 GPI para ejercer su actividad anticoagulante, estableciendo así a la β_2 GPI como uno de los principales antígenos del AL^{22,23}. Por otro lado, en 1991 *Bervers et al.* describen la importancia de la protrombina (PT) en la reactividad de algunos AL²⁴, demostrando que la PT actúa como otro antígeno de los aFL específicamente en aquellos pacientes con AL positivo. Actualmente, se puede diferenciar la actividad de AL dependiente de la β_2 GPI y la dependiente de PT, debido a que al adicionar CL se inhibe la actividad del AL dependiente de β_2 GPI no así la dependiente de PT en el ensayo de TTPa, ya que la β_2 GPI se une principalmente a CL, mientras que la PT se une a FTS²⁵.

1.6 Anticuerpos anticardiolipina (aCL)

Los aCL son anticuerpos de isotipo IgG, IgM e IgA que reconocen el complejo CL- β_2 GPI, los cuales están relacionados con la patogénesis del SaF. Aunque también existen los denominados aCL “verdaderos” que reconocen a la CL en ausencia de β_2 GPI o PT y están relacionados con enfermedades infecciosas a títulos elevados²⁶ y además están presentes en individuos sanos (como anticuerpos aFL naturales ocultos, entre otros)²⁷.

Actualmente los ensayos comerciales para la detección de los aCL únicamente detectan el complejo CL- β_2 GPI, por lo que no es posible la detección de los aCL verdaderos, debido a que los anticuerpos aCL dirigidos contra el complejo CL- β_2 GPI presentan una mayor asociación con las manifestaciones clínicas del SaF que los aCL verdaderos^{28,29}. Además, se observa el mismo efecto sobre los aCL

1.7 β_2 -glicoproteína I

La β_2 GPI es una glicoproteína plasmática de 326 residuos de aminoácidos con un peso aproximado de 50 kDa. El 20% de su peso total lo componen los carbohidratos [Figura 2A]. Se encuentra en plasma a concentraciones entre 150 a 300 μ g/mL^{31,32}. Anteriormente se le denominaba como apolipoproteína H por su asociación con lipoproteínas cuando fue descubierta; actualmente sólo se denomina β_2 GPI³³. Es sintetizada en hígado y placenta^{34,35}. Por su conformación tridimensional se puede ubicar dentro de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento (*Complement control protein*; CCP)³⁶ aunque no cumpla esa función, las CCP se caracterizan por presentar dominios repetidos de aproximadamente 60 residuos de aminoácidos unidos por puentes disulfuro denominados dominios “*Sushi*” [Figura 2B]³². Además la β_2 GPI presenta un sitio de unión a FL que se localiza en el dominio V [figura 2C], en una región rica en lisinas presente entre los residuos de aminoácidos del 280 al 288^{37,38}. Por otro lado, contiene cinco cadenas de carbohidratos de *N*-glicosilaciones, cuatro en el dominios III (N149, N162, N184 y N194) y una en el dominio IV (N253)³⁹. Estas cadenas de carbohidratos presentan pequeñas modificaciones en sus terminales lo que se denomina microheterogeneidad de la β_2 GPI [Figura 2D] y son capaces de alterar la afinidad hacia los FL entre 0.1 a 2.0 μ M⁴⁰.

Por otra parte, la β_2 GPI se encuentra en circulación sanguínea en forma cerrada [Figura 3A], interactuando el dominio I con el dominio V, aunque también se ha descrito la interacción del dominio I con los carbohidratos presentes en el dominio III dando lugar a la forma S [figura 3B]⁴¹. Cuando la β_2 GPI se une a los FL

se produce un cambio conformacional de la estructura terciaria de la proteína [Figura 3C] permitiendo la exposición de epítomos críticos, los cuales son reconocidos por los aFL [Figura 3D]^{42,43}.

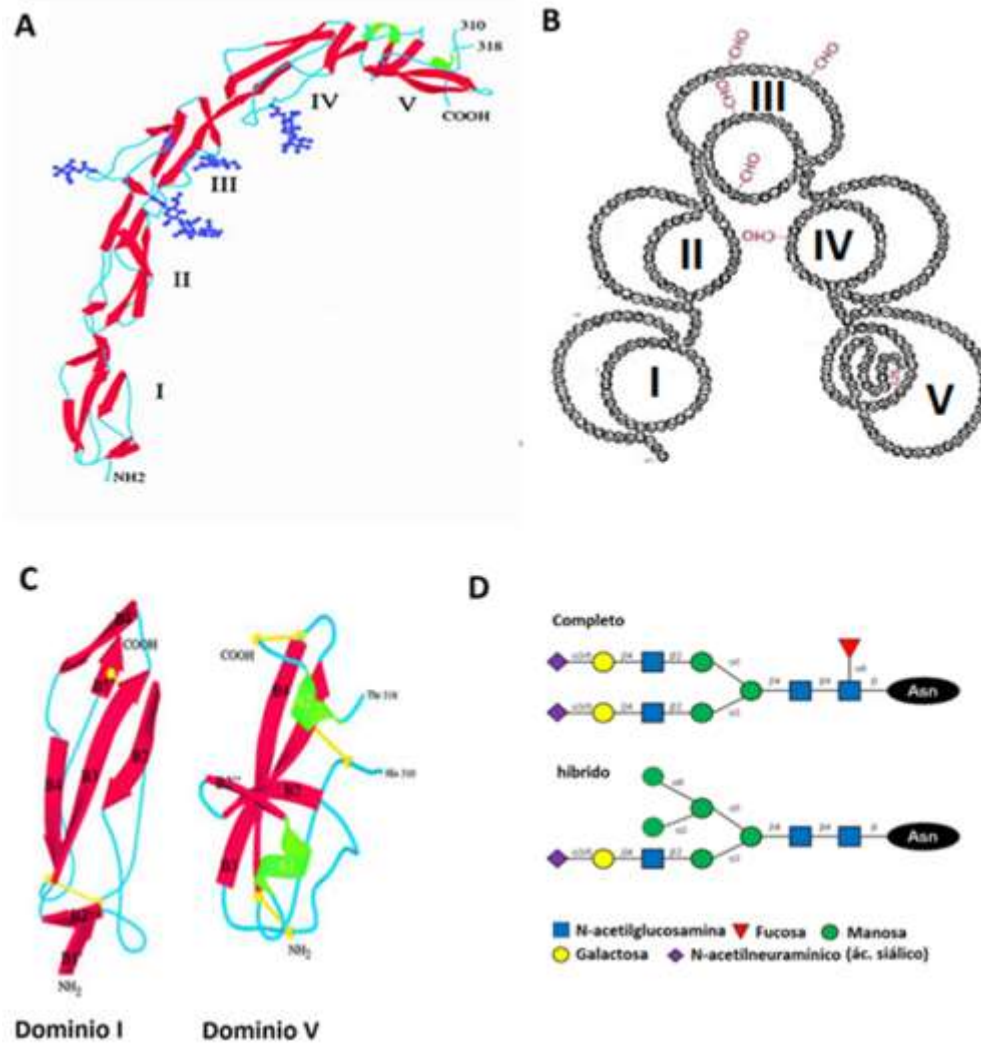


Figura 2. **Estructura conformacional de la β_2 GPI.** A) Conformación tridimensional de la β_2 GPI, en verde sitio de unión a FL, azul fuerte cadenas de carbohidratos, en rojo estructura β -plegada y en azul claro plegamiento aleatorio; B) Representación esquemática de los dominios tipo “*sushi*” de la β_2 GPI y C) conformación tridimensional de los dominios I y V; y D) Representación esquemática de la cadena de carbohidratos (microheterogeneidad), cadena con terminales iguales (completa) y con terminales distintas (híbrida). Figura modificada de *Bouma et al.*³⁷ y *Koike et al.*⁹³

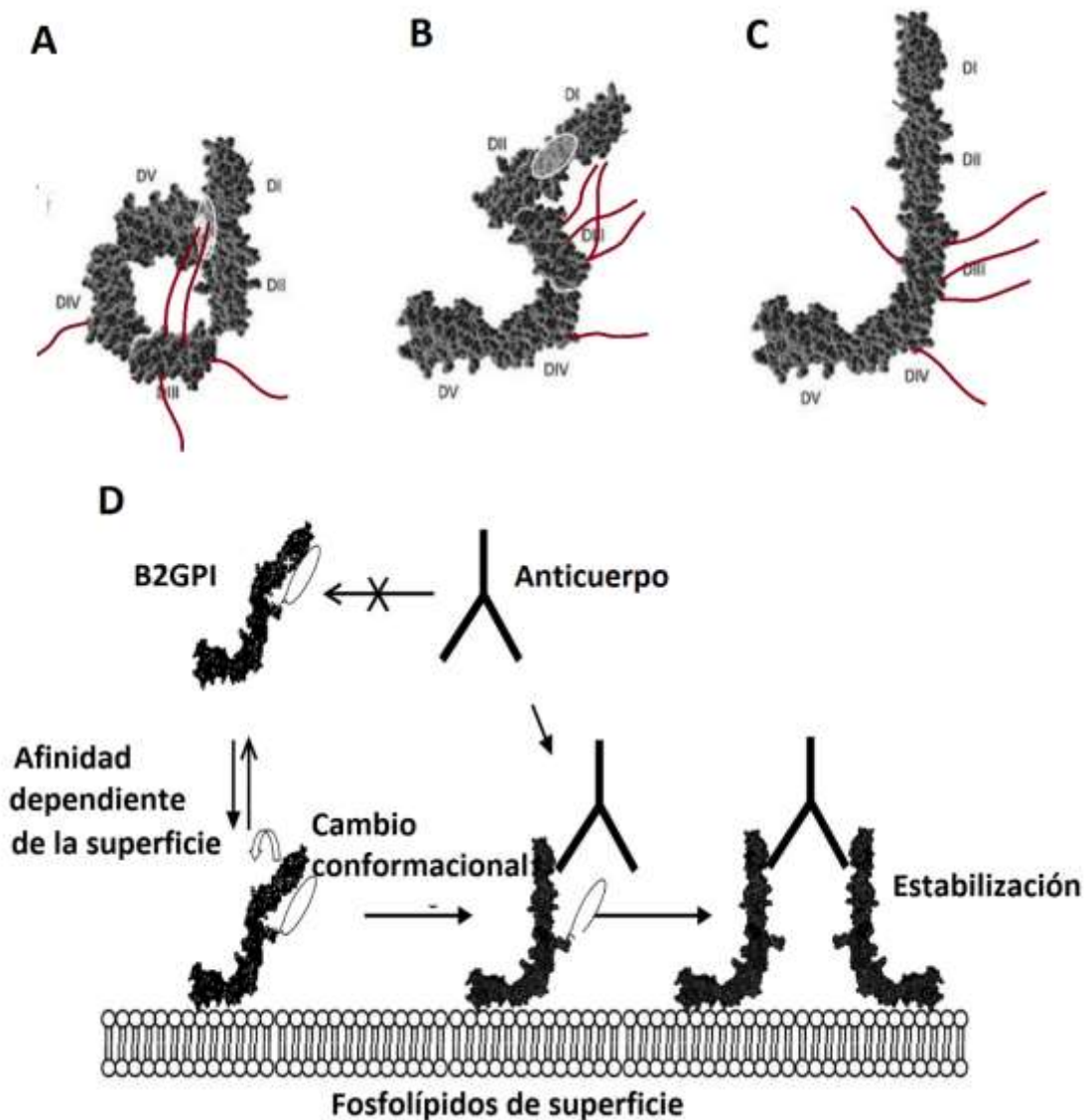


Figura 3. **Modelo del cambio conformación β_2 GPI:** A) β_2 GPI cerrada, interacción entre el dominio I, V y las cadenas de carbohidratos presentes en el dominio III; B) β_2 GPI en forma S, interacción entre el dominio I y los carbohidratos y C) β_2 GPI abierta. En rojo se representan las cadenas de carbohidratos; D) Mecanismo de unión de anticuerpos a la β_2 GPI, los aFL no se pueden unir a la β_2 GPI libre, cuando la β_2 GPI se une a la membrana sufre un cambio conformacional que permite la exposición del epítipo en el dominio I y es reconocido por los aFL, el reconocimiento se estabiliza por la dimerización de la β_2 GPI. Figura modificado de *Agar et al.*⁴¹ y *de Laat et al.*⁶²

La principal función descrita de la β_2 GPI es su capacidad anticoagulante, ya que es capaz de interactuar con diversos componentes de la cascada de coagulación y de la vía fibrinolítica [Figura 4] ocasionando prolongación del tiempo de generación de trombina^{32,44}. La β_2 GPI compite con los factores de coagulación en la unión a FL de las membranas de células endoteliales y plaquetas. Por otro lado, la plasmina y el FXa (menos eficiente) pueden romper a la β_2 GPI en el dominio V (K317-T318) *in vitro* impidiendo así su unión a FL^{45,46}. Este fenómeno se potencia en presencia de heparina, que inhibe la generación de plasmina por el activador de plasminógeno tisular (APt). Esta conversión es un evento importante en el sistema fibrinolítico. La β_2 GPI escindida se encuentra presente en pacientes con AL; además, genera *in vivo* un importante mecanismo de autorregulación entre la β_2 GPI y los factores de coagulación [Figura 4]^{47,48}. También, se ha observado que la β_2 GPI inhibe la participación del FXII en presencia de FL e inhibe la activación del FX en presencia de plaquetas activadas; dicha inhibición es interrumpida por la presencia de aFL^{49,50}. Por otro lado, la β_2 GPI, se une *in vitro* al FXI (con una afinidad semejante a la de los Cininógenos de Alto Peso Molecular; HMWK) inhibiendo así la activación por trombina y el FXIIa. La escisión de la β_2 GPI interrumpe la inhibición pero no su unión⁵¹. Además, la sustitución de los HMWK facilita no sólo la inhibición, sino también la subsecuente escisión de la β_2 GPI por parte de la plasmina en el coágulo⁵². Lo anterior sugiere que la principal acción anticoagulante en condiciones fisiológicas normales es la inhibición de la activación de la vía intrínseca de la coagulación³².

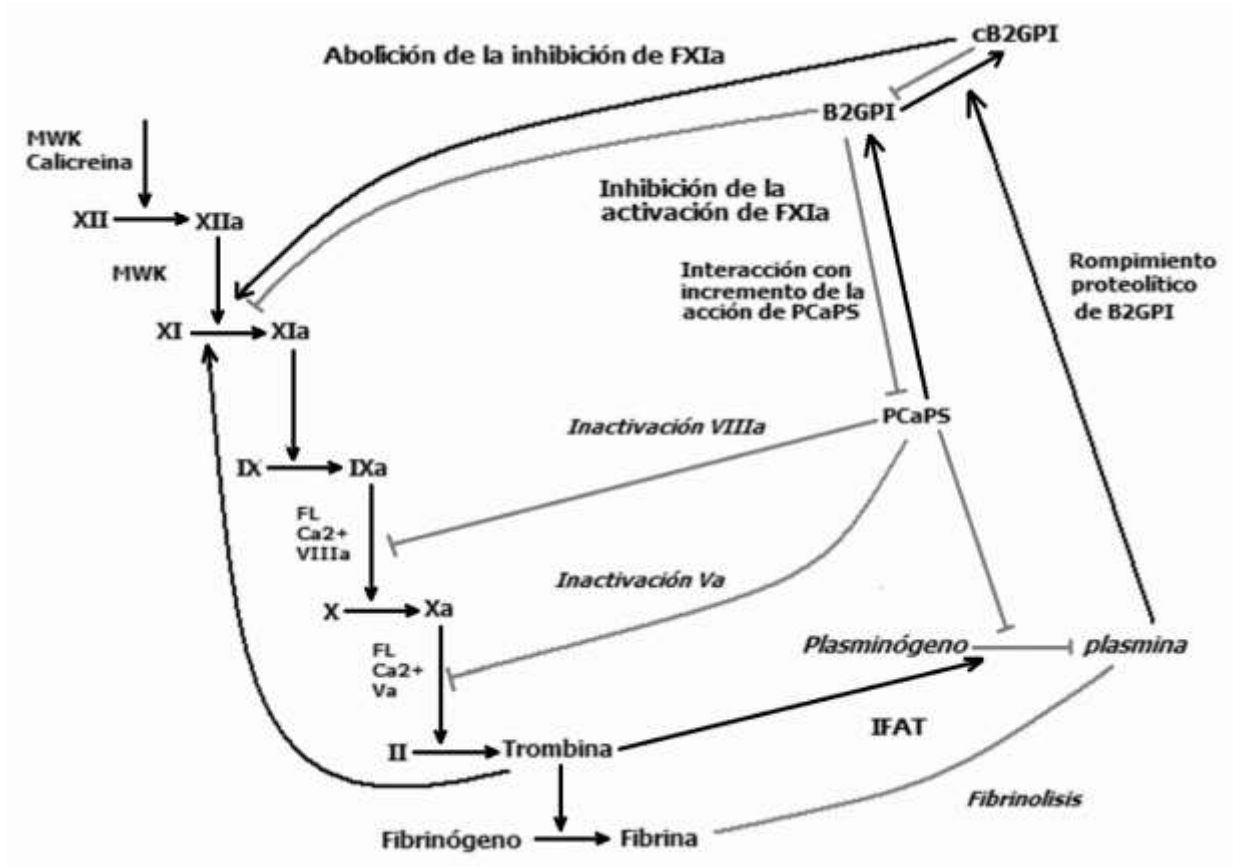


Figura 4. Participación de la β_2 GPI en la cascada de la coagulación y mecanismo fibrinolítico. En flechas grises, las vías de inhibición de la cascada de coagulación donde participa la β_2 GPI dependientes de FL; en flechas negras vías de activación de la cascada de coagulación donde participa la β_2 GP-I. Figura modificada de Miyakis et al.³²

Por su parte, la acción procoagulante de la β_2 GPI incluye la inhibición de la degradación del FVa por la proteína C activada por proteína S (PCaPS); la inhibición es potenciada por la presencia de aFL⁵³. Además, la escisión de la β_2 GPI por plasmina neutraliza la inhibición en la activación del FXI por la β_2 GPI, dando como resultado una activación excesiva de la coagulación y la formación de trombina⁵². La trombina por su parte inhibe la producción de plasmina vía el inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (IFAT) [figura 4]. Además la β_2 GPI

escindida inhibe la activación del plasminógeno por la plasmina, atenuando el sistema fibrinolítico⁵¹.

1.8 Anticuerpos anti- β_2 GPI

En 1990, tres grupos distintos reportaron que los aFL presentes en suero de pacientes con SaFP o SaFS requieren β_2 GPI para ser detectados *in vitro*^{28,54,55}. Desde entonces, varios grupos han reportado la importancia de la β_2 GPI en el reconocimiento de los aFL patogénicos en pacientes con SaF⁵⁶. Este reconocimiento principalmente se debe al cambio conformacional que sufre la β_2 GPI al unirse con los FL⁴².

Los primeros indicios del cambio conformacional los describieron *Matsuura et al.* en 1994, encontrando que los aFL poli y monoclonales murinos contra la β_2 GPI en placas de poliestireno irradiadas en ausencia de CL presentan reactividad similar a la reactividad contra el complejo de CL- β_2 GPI y esta reacción es inhibida cuando se adiciona el complejo CL- β_2 GPI⁵⁷. Este efecto también fue observado por *Chamley et al.* demostrando que el reconocimiento de los aFL se debe a un cambio conformacional de la β_2 GPI y la probable exposición de epítomos críticos [Figura 3D]⁵⁸.

Por su parte *Roubey et al.* proponen que el reconocimiento en placas irradiadas se debe al incremento en la densidad del antígeno y no a la exposición de los epítomos críticos⁵⁹. Posiblemente esta discrepancia se deba a que ambos grupos de investigación utilizaron dos técnicas distintas en la cuantificación o bien sea por la misma heterogeneidad de los anticuerpos utilizados. Otra posible

explicación es mostrada por *Igarashi et al.* donde encuentran en una β_2 GPI recombinante mayor reactividad de los aFL debido posiblemente a la dimerización espontánea de la misma recombinante tanto en placa irradiada como no irradiada, lo que sugiere la importancia de la unión bivalente de los aFL con el proceso de dimerización que permite la exposición de epítomos críticos^{60,61}.

Por otro lado, uno de los principales epítomos críticos expuestos después del cambio conformacional se localiza en el dominio I⁶². El primer estudio que muestra la participación del dominio I fue realizado por *Iverson et al.* en 1998, ellos utilizaron dominios recombinantes y encontraron que el dominio I es capaz de inhibir la interacción de los aFL contra la β_2 GPI nativa⁶³. Estudios posteriores con mutaciones puntuales demuestran la participación de la región R39-R43 del dominio I en el reconocimiento de los aFL^{64,65}. Además, el dominio I presenta mayor asociación con el riesgo de trombosis y morbilidad en el embarazo comparado con otros dominios de la β_2 GPI^{66,67}.

Otro factor importante para el reconocimiento de los aFL es el polimorfismo en la β_2 GPI, debido a que dirige el reconocimiento y la exposición de epítomos cuando hay cambios conformacionales inducidos por la interacción con FL. Actualmente, se conocen cuatro polimorfismos en la β_2 GPI, localizados en las posiciones: 88, 247, 306 y 326⁶⁸. El polimorfismo más estudiado es en la posición 247 (V/L) localizado en el dominio V muy cerca del sitio de unión a FL. Este polimorfismo afecta la función de la β_2 GPI y el reconocimiento de los anti- β_2 GP-I. Además, se observa mayor prevalencia del homocigoto V/V247 en pacientes con SaF comparado con sujetos sanos en población japonesa y mexicana^{69,70,71,72}.

Por otro lado, los aFL pueden ocasionar la sobre-expresión de moléculas de adhesión vía unión con β_2 GPI como ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina en endotelio vascular⁷³. También, inducen la señalización por complejos multiproteicos que incluyen Anexina A2, TLR4 (acrónimo del inglés *Toll-Like Receptor 4*) y calreticulina. En el caso del TLR4, la activación es vía MyD88 terminando con la activación del factor nuclear κB (NF- κB)^{74,75,76}, mientras que en monocitos se incrementa la expresión del FT y liberación de TNF α vía anexina A2, TLR4 y las balsa lipídicas (*lipids rafts*)⁷⁷. Otros experimento muestran la participación de TLR2 y CD14 en la activación de monocitos y células endoteliales [Figura 5]⁷⁸ y ciertos estudios proponen la participación del CD40 en la activación del endotelio, con base en la similitud de la región del 239 al 245 del CD40 con el segmento de los residuos de aminoácidos del 7 al 13 de la β_2 GPI, el cual se localiza en el dominio I, debido a que se encontraron anticuerpos de la región antes mencionada del CD40 en pacientes con SaF⁷⁹.

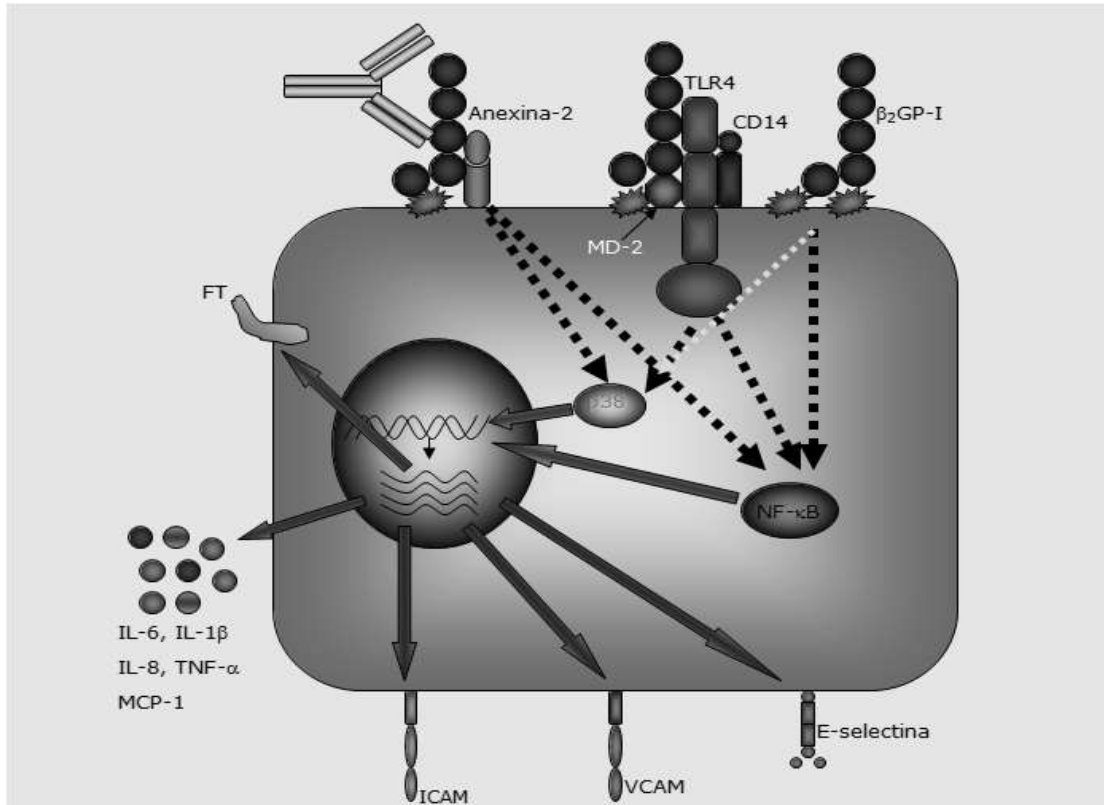


Figura 5. **Activación de células endoteliales vía complejo aFL-β₂GPI.** Activación vía FTS, CD14, TLR2 y TLR4. Expresión de moléculas de adhesión, liberación de citocinas proinflamatorias y la expresión del FT. Figura basada de Ma et al.⁷⁴; Allen et al.⁷⁵; Raschi et al.⁷⁶; Sorince et al.⁷⁷ y Satta et al.⁷⁸

En plaquetas, los complejos aFL-dímeros de β₂GPI interaccionan mediante el receptor 2 de la apolipoproteína E (ApoER2; miembro de los receptores de lipoproteínas de baja densidad, que se expresa en plaquetas y trofoblastos) y la glicoproteína Ib-IX-V induciendo la activación plaquetaria [Figura 6]^{80,81,82}, ocasionando presencia de trombos ricos en plaquetas. Por otro parte, diversos estudios han mostrado la participación de los complejos aFL-β₂GPI en la desregulación de la hormona gonadotropina coriónica humana en los trofoblastos *in vitro*, lo que podría explicar la pérdida fetal *in vivo*^{83,84}.

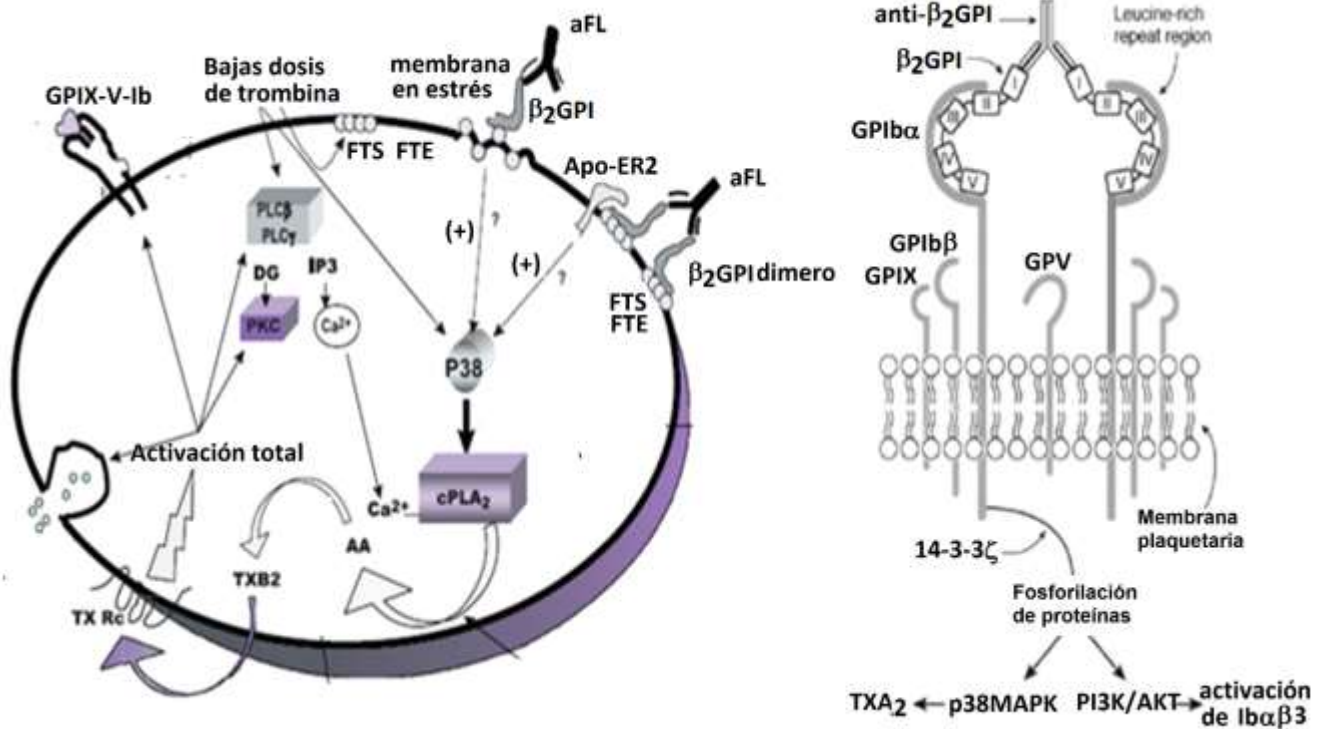


Figura 6. **Activación plaquetaria vía complejo aFL-β₂GPI.** Activación p38 en plaquetas vía receptor 2 de apolipoproteína E y complejo glicoproteína Iba-V-IX. Figura modificada de *Shi et al.*⁸¹ y *Canobbio et al.*⁸²

Si bien los reportes actuales muestran cambios conformacionales de la β₂GPI con una subsecuente exposición de epítodos críticos que permiten la unión de los aFL, todavía se desconoce la participación de las cadenas de carbohidratos. El presente trabajo muestra que la eliminación del ácido siálico en las cadenas de carbohidratos de la β₂GPI es suficiente para incrementar la reactividad de los aFL, y también permite la diferenciación de células U937 a monocitos, demostrando que las cadenas de carbohidratos participan en la protección de epítodos críticos en la β₂GPI.

2. Justificación del proyecto

Si bien diversos estudios muestran la existencia de epítomos en los cinco dominios de la β_2 GPI, aún se desconoce la participación que tienen las cadenas de carbohidratos de la β_2 GPI en su reconocimiento por los anticuerpos anti- β_2 GPI. No obstante que la β_2 GPI es una proteína altamente glicosilada, los estudios reportados con respecto a los carbohidratos sólo describen cierta participación, pero no son concluyentes. Es por ello que el presente trabajo permitirá entender posibles mecanismos involucrados en el reconocimiento y participación de los carbohidratos de la β_2 GPI en los procesos trombóticos asociados al SaFP.

3. Hipótesis

Las cadenas de carbohidratos de la β_2 GPI cubren epítomos críticos e impiden la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI contra la β_2 GPI. La disminución o eliminación de las cadenas de carbohidratos en la β_2 GPI, permiten la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI, además de la activación y diferenciación celular.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar la participación de las cadenas de carbohidratos de la β_2 GP-I en la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI de pacientes con SaFP.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI de pacientes con SaFP, mediante ensayos de ELISA contra β_2 GPI nativa, β_2 GPI parcial o totalmente desglicosilada.
2. Estudiar si los complejos de anticuerpos anti- β_2 GPI-glicoformas de la β_2 GPI, son capaces de activar y diferenciar células U937, mediante la detección de marcadores de diferenciación CD14, CD11c y HLA-DR.
3. Determinar la presencia de las citocinas: IL-4, IL-6, IFN γ y TNF α mediante luminometría en el sobrenadante de los cultivos de células U937, estimuladas con complejos anticuerpos-glicoformas de la β_2 GPI.

5. Metodología

5.1 Pacientes

Se obtuvieron sueros de pacientes que cumplían los criterios de clasificación de *Sydney* y *Alarcón-Segovia* para el síndrome de antifosfolípidos primario (SaFP)^{8,10}. Se excluyeron los pacientes que presentaron criterios de clasificación de Lupus Eritematoso Generalizado o que tuvieran anticuerpos anti-ADN positivo⁸⁵. Además se recolectaron sueros de sujetos sanos que no presentaron alguna morbilidad en el momento de la toma de muestra.

5.2 Purificación de la β_2 GPI

Se realizó la purificación de la β_2 GPI de acuerdo con lo reportado por *Schousboe et al.*⁸⁶. Brevemente, se filtró 100mL de plasma en una malla separadora de células (*GIBCO*) y se agregó 3.5 mL de HClO₄ al 70%, la mezcla se incubó a temperatura ambiente en agitación suave durante 30min. Transcurrido el tiempo de la incubación, la mezcla se centrifugó a 6,000 x g durante 30min a 5°C. Se ajustó el sobrenadante a un pH de 8.0 utilizando NaOH 1M. Se dializó contra tres cambios del amortiguador Tris-HCl (Tris 20mM; pH 8.0) durante 48 horas. El dializado se colocó en un tubo cónico de 50mL (*Falcon*) y se pasó por una columna de heparina (HiPrep 16/10 Heparin FF; *Amersham Bioscience*) previamente equilibrada con amortiguador de Tris-HCl en el equipo *ÅKTA prime* (*Amersham Pharmacia Biotech*). La muestra se pasó por la columna de heparina a un flujo de 5mL/min y se lavó con 5 camas de la columna con amortiguador Tris-HCl. Posteriormente, se eluyeron las proteínas con distintas soluciones de sales

[1) Tris-HCl 20mM, NaCl 30mM; 2) Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM y 3) Tris-HCl 20mM, NaCl 1M], Se recuperó la segunda fracción de elución de la β_2 GPI y se dializó contra PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 2 mM; pH 7.4). Posteriormente, se pasó por una columna de anticuerpos anti- β_2 GPI previamente equilibrada con PBS. La columna se lavó con cinco camas de la columna con PBS y se eluyó con amortiguador de Glicina (Glicina 50mM, NaCl 150mM, pH 2.2) se recolectó la β_2 GPI en 300 μ L de amortiguador de neutralización (Tris-HCl, pH 9.0). Posteriormente la β_2 GPI se dializó contra PBS durante 40 horas y se concentró la proteína en *Amicon-Ultra (Ultracel 30K, Millipore)*. La pureza se determinó mediante electroforesis de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%.

5.3 Purificación de anticuerpos de isotipo IgG

Se adicionaron 200 μ L del suero de pacientes y sujetos sanos por separado a 600 μ L de PBS y la dilución se colocó en una columna de centrifugación con proteína *A-sepharosa (SIGMA)* previamente equilibrada con PBS y se incubó por una hora a 25°C. La columna se centrifugó a 10,000 x g por 5 min. Se realizaron 3 lavados de la columna con 1mL de PBS y se eluyeron los anticuerpos de la columna con 1mL de amortiguador de glicina. Se recolectaron los anticuerpos eluidos en 300 μ L de amortiguador de neutralización. Posteriormente se dializaron los anticuerpos con tres cambios de PBS durante 48 horas y se ajustó la concentración a 1mg/mL de inmunoglobulinas. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE al 12%.

5.4 Generación de las glicofomas de la β_2 GPI

5.4.1 Desglicosilación completa de la β_2 GPI (cd β_2 GPI).

Se realizó la desglicosilación completa mediante el equipo *GlycoProfile IV Chemical Deglycosylation Kit* (SIGMA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En resumen, se colocaron 50 μ L de ácido trifluorometano sulfónico (SIGMA) en un frasco de vidrio con 100 μ g de β_2 GPI previamente enfriada y se incubó durante 5 min en hielo seco/etanol; posteriormente el frasco se agitó brevemente y se incubó durante 4 hora a -20°C. Se adicionó 150 μ L de una solución de piridina (SIGMA) y se colocó el frasco en hielo seco durante 20 min, la muestra se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 2mL y se adicionó 400 μ L de solución de neutralización (SIGMA), el tubo se incubó a 4°C durante 30 min y se centrifugo a 10,000 x g durante 15 min a 4°C; el precipitado se resuspendió en 500 μ L de PBS. Se concentró con *Amicón-Ultra 30K* (Millipore) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.4.2 Desglicosilación Parcial de la β_2 GPI (pd β_2 GPI; remoción del ácido siálico)

Se realizó la desglicosilación parcial utilizando el equipo *Enzymatic Protein Deglycosylation Kit* (SIGMA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En resumen, se disolvió 100 μ g de β_2 GPI en 45 μ L de amortiguador de reacción (SIGMA) y se adicionó 2 μ L de neuroaminidasa (SIGMA) y 3 μ L de H₂O. Se incubó la reacción a 37°C durante toda la noche. Se verificó la dp β_2 GPI mediante SDS-PAGE al 12%. La reacción se diluyó en 500 μ L de PBS y se pasó por una columna

de heparina y se realizó el mismo procedimiento como se establece en el segmento 2.2 con ciertas modificaciones, utilizándose únicamente la solución de elución 3.

5.5 Medición espectrométrica de las glicofomas de la β_2 GPI.

Se ajustó la concentración de las glicofomas a una concentración de 0.1mg/mL en PB y se leyó en el UV cercano utilizando el espectropolarímetro JASCO J-720. Se reportaron las señales de DC como elipticidad residual media (θ), usando un valor de 110 para el peso molecular de la media residual. Los perfiles térmicos fueron obtenidos del barrido de 25°C a 90°C con un calentamiento de 1°C/min, seguido de un cambio de elipticidad a 222nm. Se realizaron los espectros de fluorescencia en el espectrofluorómetro Olis DM45 scanning usando una longitud de excitación a 290nm y los resultados fueron reportado como unidades arbitrarias (UA).

5.6 Reactividad de los anticuerpos IgG contra β_2 GPI y cardiolipina (CL).

Se utilizaron placas comerciales de ELISA para β_2 GPI y cardiolipina (aCL) [QUANTA Lite, INOVA Diagnostic] de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En resumen, se adicionó 100 μ L de una dilución 1:100 de los sueros en amortiguador de dilución (INOVA). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente, se realizaron lavados con amortiguador HRP (INOVA) y se adicionó 100 μ L de un anticuerpo anti-humano conjugado con HRP (INOVA) y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se lavó la placa con amortiguador HRP. Se adicionó 100 μ L

de TMB (*INOVA*) y se incubó 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó solución de paro (*INOVA*) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se leyó la placa a 450nm y los resultados se interpolaron en la curva previamente establecida por el equipo *QUANTA Lite* y se reportaron como unidades de anticuerpos antifosfolipidos IgG (UGPL). La positividad se determinó utilizando el valor de referencia de aCL y anti- β_2 GPI de isotipos IgG (\leq 8.4 UGPL para ambas pruebas) obtenido mediante percentila 95

5.7 Reactividad contra las glicofomas de la β_2 GPI y el complejo CL-glicofomas

5.7.1 Reactividad contra las glicofomas de la β_2 GPI

Se sensibilizaron tres placas de poliestireno de 96 pozos (*Nunc Inc; Danemark 97F*) con 100 μ L por separado de β_2 GPI, dp β_2 GPI y dc β_2 GPI disueltos en PBS para obtener una concentración final de 10 μ g/mL por pozo. Se incubaron las placas toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con 300 μ L de PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T) y se bloquearon con albúmina sérica bovina (ABS) al 1.5% en PBS (PBS-A) durante 2h a 37°C. Después, se realizaron 3 lavados con 300 μ L PBS-T por pozo y se adicionaron 50 μ L de anticuerpos purificados disueltos en PBS-A para obtener una concentración final de 10 μ g/mL por pozo y se incubó durante 1h a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBS-T y se adicionó 50 μ L de anticuerpos de ratón anti-IgG humana conjugado por HRP (*SIGMA*) por pozo a una dilución 1:5000 en PBS-A y se incubó la placa 1h a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBS-T y se adicionó 100 μ L de TMB (*ORGENTEC*)

por pozo como sustrato, pasados 20 min se adicionó 100µL de ác. o-fosfórico (ORGENTEC) por pozo y se leyeron las placas en un lector de ELISA (Sunrise; TECAN) a 450nm, los resultados se reportaron como densidades ópticas (DO).

5.7.2 Reactividad contra el complejo CL-glicofomas de la β_2 GPI

Se sensibilizaron tres placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC) con 100µL de CL disuelta en metanol para obtener una concentración final de 50µg/mL por pozo. El metanol se evaporó en una cámara de N₂. Se bloqueó la placa con 300µL de PBS-A durante 2 horas, posteriormente se adicionó 100µL por separado de β_2 GPI, dp β_2 GPI y dc β_2 GPI disueltos en PBS para obtener una concentración final de 10µg/mL por pozo. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron los ELISA de acuerdo al segmento 5.7.1, modificando la solución de lavado, utilizando únicamente PBS como solución de lavado.

5.7.3 Curva dosis-respuesta

Se sensibilizaron distintas placas poliestireno de 96 pozos con 100µL por separado de β_2 GPI, dp β_2 GPI y dc β_2 GPI disueltas en PBS para obtener diferentes concentraciones por pozo [0, 3, 5, 10, 15, 20 y 50µg/mL]. Se incubaron las placas toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó los ELISA de acuerdo al segmento 5.7.1.

5.8 Ensayos de inhibición contra las glicofomas de la β_2 GPI

Se colocaron 200µL por separado de β_2 GPI, dp β_2 GPI, dc β_2 GPI y ASB como control, disueltas en PBS para obtener diferentes concentraciones [0, 3, 5, 10, 15 y

20µg/mL] en tubos de microcentrifuga de 1.5mL y se adicionaron 200µL de anticuerpos disueltos en PBS para una concentración final de 10µg/mL en cada uno de los tubos. Se incubaron las reacciones durante 16h a 4°C en agitación suave y se realizó ELISA en placas previamente sensibilizadas con los distintos antígenos. Los valores obtenidos fueron reportados como porcentaje de inhibición y se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = [(OD \text{ anti-}\beta_2\text{GPI} - OD \text{ anti-}\beta_2\text{GPI con inhibidor}) / OD \text{ anti-}\beta_2\text{GPI}] \times 100$$

5.9 Marcadores de diferenciación celular y medición de citocinas de cultivos de células U937 estimulados con los complejos aFL-glicoformas.

5.9.1 Cultivos celulares.

Se cultivaron 500,000 células U937 en placas de 24 pozos con 3mL por pozo de medio RPMI 1640 (GIBCO) [suplementado con 10% de SBF (GIBCO), 2mM de L-glutamina (BioWhittker, Cambrex), 1% estreptomocina-penicilina (GIBCO) y 10mM HEPES (GIBCO)] y se incubaron los cultivos toda la noche a 37°C en una atmósfera húmeda, con 5% CO₂. Se lavaron los cultivos con PBS y se adicionó 3mL por pozo de medio RPMI 1640 sin SBF [suplementado con 10mM de L-glutamina, 1% estreptomocina-penicilina y HEPES], se incubaron por 2 horas y se adicionó por separado 100µL por pozo de β₂GPI, dpβ₂GPI, dcβ₂GPI y PMA como control, para obtener una concentración final de 10µg/mL. Se incubaron por 2 horas en agitación suave. Posteriormente, se adicionaron 100µL de los anticuerpos disueltos en PBS para obtener una concentración final de 50µg/mL y

se incubaron durante 6 horas a 37°C. Se recolectaron las células para medir diferenciación a monocitos y el sobrenadante para medir niveles de citocinas.

5.9.2 Medición de citocinas.

Se realizó la cuantificación de citocinas mediante el equipo de *Human cytokine* (Millipore). En resumen, se adicionaron 25µL de amortiguador de ensayo por pozo (Millipore) en una placa de 96 pozos con fondo de filtro previamente bloqueado con 200µL de amortiguador de ensayo (Millipore). Posteriormente se adicionaron 25µL del sobrenadante de los cultivos celulares y se adicionaron 25µL de la mezcla de las perlas para cada citocina (IL-4, IL-6, INF-γ, TNF-α) por pozo y se incubó la placa toda la noche a 4°C con agitación. Se realizaron dos lavados con 200µL por pozo de amortiguador de lavado (Millipore), la solución de lavado se removi6 por vac6o y el remanente de la soluci6n se elimin6 mediante un papel absorbente. Se adicionaron 25µL de anticuerpo de detecci6n (Millipore) por pozo y se incub6 durante 1h a temperatura ambiente en agitaci6n. Posteriormente, se adicionaron 25µL de estreptavidina-ficoeritrina (Millipore) por pozo y se incub6 en oscuridad durante 30min a temperatura ambiente en agitaci6n. Se realizaron dos lavados con amortiguador de lavado y se adicionaron 100µL de *Sheath Fluid* (Millipore) por pozo; la placa se incub6 por 5 min en agitaci6n y se ley6 en el equipo de Lincoplex 200. Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva de 5 parametros, previamente establecida por el equipo *Human cytokine* con el programa *Luminex 100 IS 2.3* y se reportaron como pg/mL

5.9.3 Citometría de flujo de las células U937

Se recolectaron los cultivos celulares de las U937; se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500µL de PBS. Se adicionaron 15 µL de la combinación de anticuerpos anti-CD14-PE/anti-CD11c-FITC y anti-CD14-PE/anti-HLA-DR-FITC por separado por tubo. Se incubaron durante 30 min en agitación y oscuridad. Se lavaron las células con PBS y se adicionó 500µL de paraformaldehído al 1% por tubo. Se leyeron 10,000 eventos en el equipo de citometría de flujo BD *accuri C6 Flowcytometer*.

5.10 Análisis estadístico.

Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante la prueba de *Kruskal-Wallis* y *U de Mann-Whitney* usando el programa *GraphPad 5.0*. Los datos son representados como mediana y rango intercuartiles; valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6. Resultados

6.1 Pacientes

Se estudiaron 24 pacientes con SaFP (15 mujeres) de 29 ± 9.8 años de edad y 9.5 ± 5.5 años de evolución y 10 sujetos sanos (7 mujeres) que no presentaron alguna morbilidad al momento del estudio. El 86% de los sueros de pacientes con SaFP fueron positivos para aCL de isotipo IgG [39.8 (6.9-130.5) UGPL] y el 96% fueron positivos para anticuerpos anti- β_2 GPI IgG [33.2 (4.9-187.5) UGPL]. Cuando se comparó la reactividad del suero de pacientes con SaFP contra la reactividad del suero de sujetos sanos, se encontró diferencias significativas para aCL IgG ($p = 0.0004$) y anti- β_2 GPI ($p = 0.0343$) [Figura 7].

6.2 Desglicosilación parcial y completa de la β_2 GPI.

Para corroborar la desglicosilación parcial y completa, se realizó una electroforesis. Se encontraron tres bandas de diferente peso molecular en distintos carriles. Una banda de aproximadamente 50 kDa perteneciente a la β_2 GPI nativa, una banda de aproximadamente 47 kDa para la $dp\beta_2$ GPI y una banda de aproximadamente de 38 kDa para la $dc\beta_2$ GPI [Figura 8].

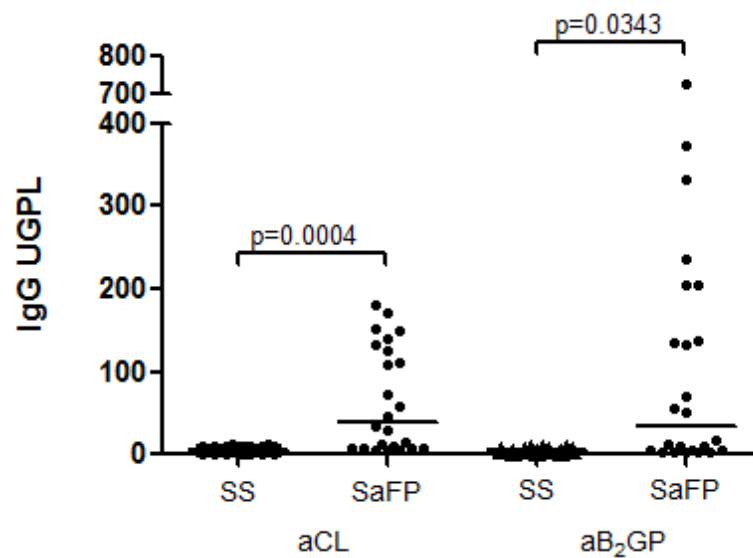


Figura 7. **Reactividad de los sueros contra aCL y β_2 GPI.** Reactividad de 24 sueros de pacientes con SaFP (●) y 10 sujetos sanos [SS] (▲) contra aCL y anti- β_2 GPI en placas de ELISA comerciales. Los resultados son representados como UGPL.

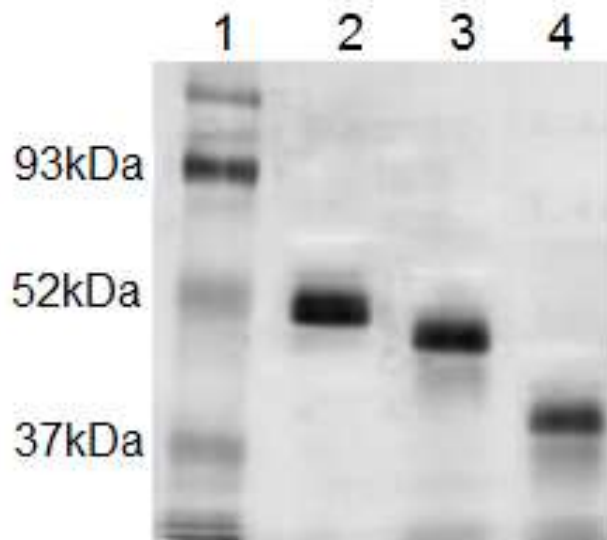


Figura 8. Electroforesis de las glicofomas de la β_2 GPI. Electroforesis en SDS-PAGE al 12% y tinción de plata. **Línea 1** = PM; **línea 2** = β_2 GPI nativa (50 kDa); **línea 3** = dp β_2 GPI (47 kDa) y **línea 4** = dc β_2 GPI (38 kDa).

6.3 Caracterización espectroscópica de las glicofomas de la β_2 GPI

Para determinar si la desglicosilación afecta la conformación de la proteína, se realizaron estudios de espectroscopía por dicroísmo circular y espectro de fluorescencia de las glicofomas de la β_2 GPI. Se encontró que la $dp\beta_2$ GPI, exhibe un espectro de DC con una pequeña variación en relación a la β_2 GPI nativa. En contraste, la glicofoma $dc\beta_2$ GPI presenta una variación alta en la señal de DC, indicando que los carbohidratos son factores determinantes en la conformación de la proteína [Figura 9a]. Además, la remoción de los carbohidratos también produjo un cambio considerable en la señal de fluorescencia [Figura 9b]. Por otro lado, se observó que la $dc\beta_2$ GPI parece conservar una conformación plegada debido a la similitud que se presenta en el barrido térmico de CD con la β_2 GPI nativa [Figura interior 9a].

6.4 Reactividad de anticuerpos IgG purificados contra las glicofomas de la β_2 GPI y complejo CL-glicofomas de la β_2 GPI.

Para determinar la reactividad de los anticuerpos IgG purificados de pacientes con SaFP y sujetos sanos contra la β_2 GPI nativa y sus glicofomas, se realizaron ELISA en placas de 96 pozos no irradiadas. Se encontró un incremento en la reactividad de las IgG de pacientes con SaFP comparada con sujetos sanos de 1.7, 1.75 y 2.7 veces para β_2 GPI, $dp\beta_2$ GPI y $dc\beta_2$ GPI respectivamente ($p=0.0078$ contra β_2 GPI y $p<0.0001$ contra $dp\beta_2$ GPI y $dc\beta_2$ GPI) [Figura 10].

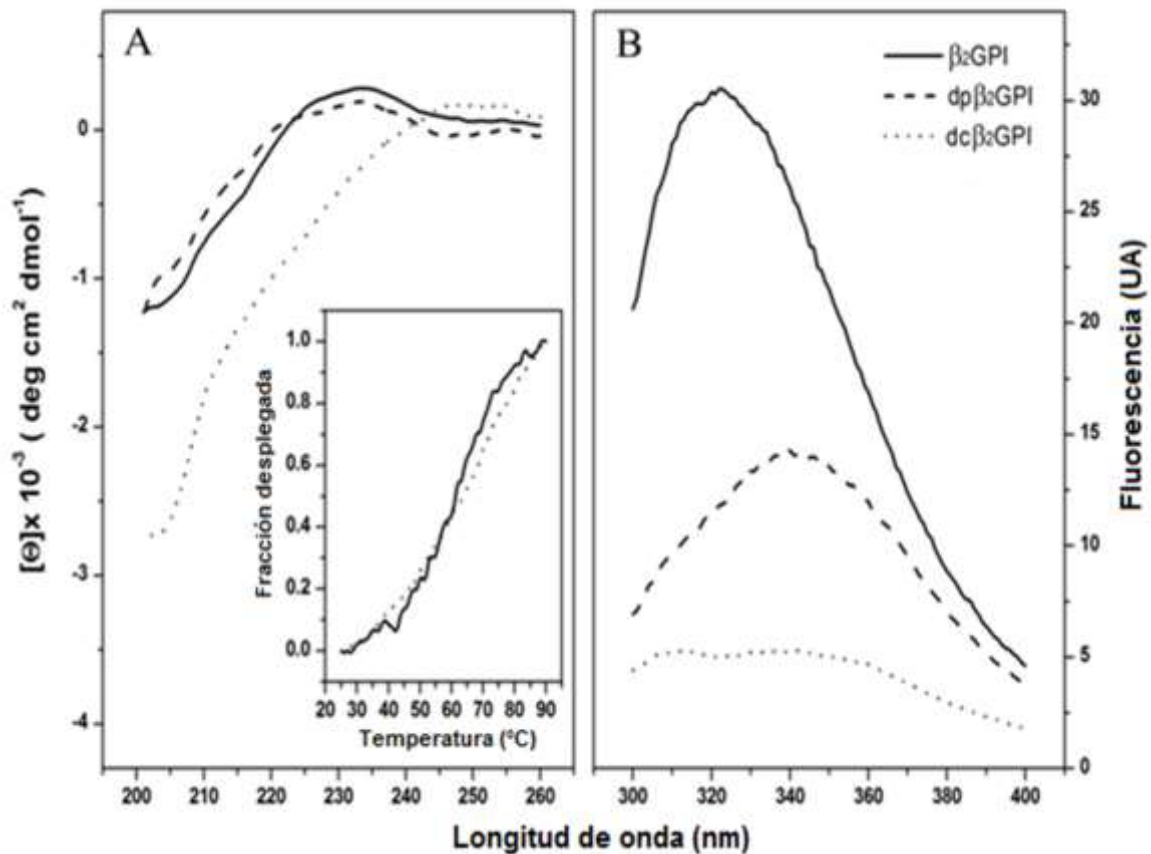


Figura 9. **Propiedades espectroscópicas de las glicofomas de la β_2 GPI.** **A)** Espectro UV cercano. Todos los espectros realizandos usando una concentración de $\sim 3 \mu\text{M}$ de las distintas glicofomas, en amortiguador de PB a 25°C , **Interior A)** Barrido térmico obtenido de la señal CD a 222 nm en una proporción de de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. La fracción aparentemente desplegada fue obtenida por normalización de la señal de CD a la temperatura en relación con la diferencia en la elipticidad a 25 y 90°C . **B)** Espectro de fluorescencia, usando una longitud de excitación de 290 nm .

Cuando se comparó la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI se encontró incremento en la reactividad contra $\text{dc}\beta_2$ GPI de 1.4 y 1.7 veces comparado contra $\text{dp}\beta_2$ GPI y β_2 GPI respectivamente ($p=0.0373$ y $p=0.0161$) [Figura 10]. No se encontró diferencias entre $\text{dp}\beta_2$ GPI y β_2 GPI. Al realizar la reactividad de los anticuerpos purificados contra los complejos CL-glicofomas de la β_2 GPI, se

encontró diferencias en la reactividad de los pacientes con SaFP contra los sujetos sanos ($p < 0.0001$ para CL- β_2 GPI y CL-dp β_2 GPI y $p = 0.006$ para CL-dc β_2 GPI) [Figura 11]. Por otro lado, no se encontró diferencias entre la reactividad de los pacientes con SaFP contra los diferentes complejos [Figura 11]. Además, al realizar una curva dosis-respuesta, se encontró incremento en la reactividad contra dc β_2 GPI y dp β_2 GPI comparada con la β_2 GPI nativa [Figura 12]

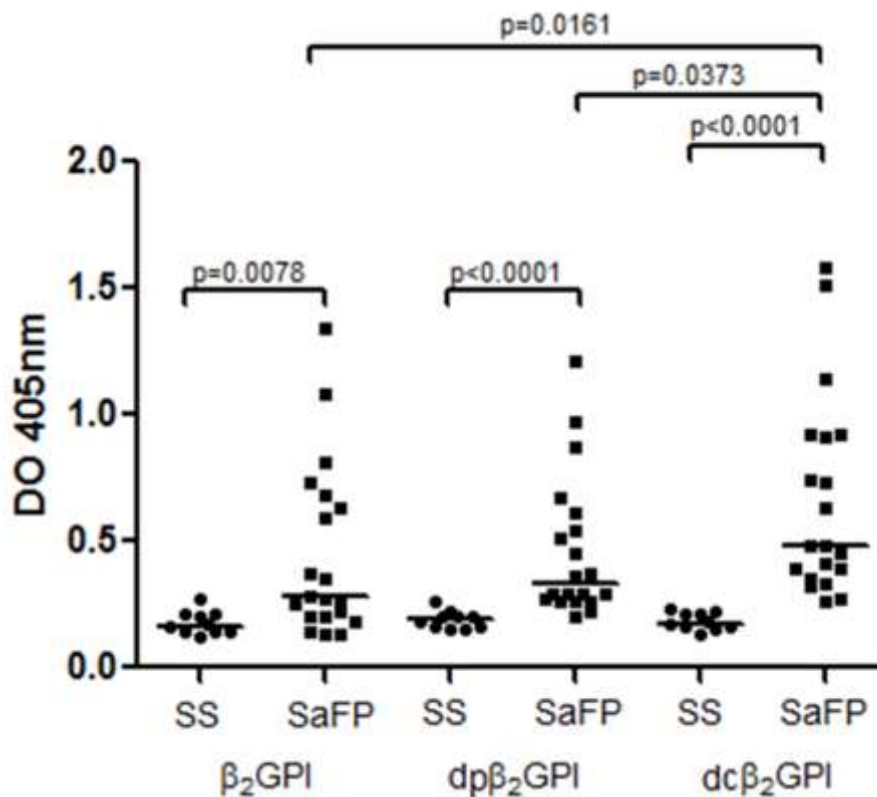


Figura 10. Reactividad de anticuerpos IgG purificados contra las glicofomas de la β_2 GPI. Reactividad de IgG de 24 pacientes con SaF (■) y 10 sujetos sanos [SS](●) en placas sensibilizadas con β_2 GPI, dp β_2 GPI y dc β_2 GPI. Los datos se representan como medianas, con valor significativo de $p < 0.05$.

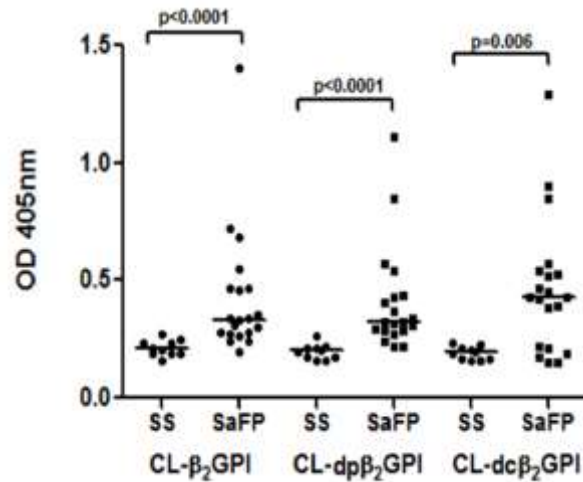


Figura 11. Reactividad de los anticuerpos IgG purificados contra los complejos CL-glicoformas de la β_2 GPI. Reactividad de IgG de 24 pacientes con SaF (■) y 10 sujetos sanos [SS] (●) en placas sensibilizadas con los complejos CL- β_2 GPI, CL-dp β_2 GPI y CL-dc β_2 GPI. Los datos son representados en mediana, con valores significativo de $p < 0.05$.

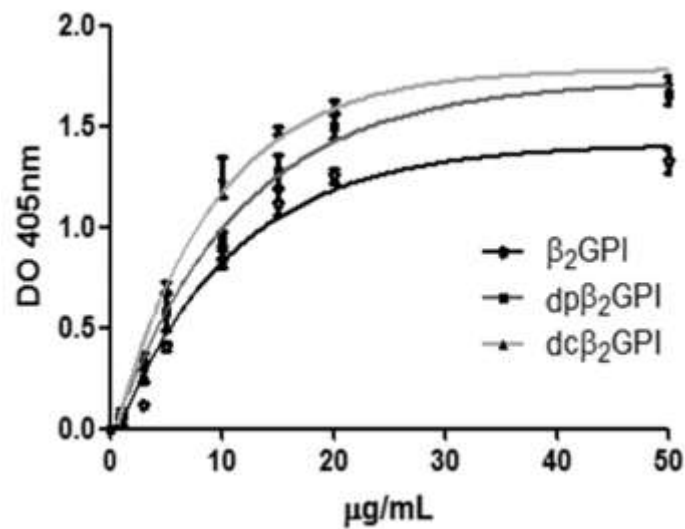


Figura 12. Curva dosis-respuesta de anticuerpos IgG purificados contra las glicoformas de la β_2 GPI. Curva dosis-respuesta de anticuerpos IgG purificados de 3 pacientes con SaFP contra las β_2 GPI nativa (◆), dp β_2 GPI (■) y dc β_2 GPI (▲). Los datos son reportados como media \pm SEM.

6.5 Inhibición de los anticuerpos IgG en fase líquida con las glicoformas de la β_2 GPI

Para determinar la capacidad inhibitoria de las glicoformas de la β_2 GPI, se realizaron ensayos de inhibición cruzada. Se encontró que la dc β_2 GPI y dp β_2 GPI inhiben más del 80% de la reactividad de los anticuerpos contra las glicoformas de la β_2 GPI en forma dosis-respuesta alcanzando una meseta a la concentración de 15 μ g/mL. Además, la β_2 GPI nativa solo inhibe un 40% de la reactividad de los anticuerpos con las distintas isoformas [figuras 13A, B y C].

6.6 Expresión de marcadores de diferenciación en células U937 inducidas por los complejos anticuerpos IgG-glicoformas

Para determinar si los complejos de anticuerpos anti- β_2 GPI-glicoformas de la β_2 GPI son capaces de diferenciar las células U937 a monocitos. Se incubaron las células U937 con las distintas glicoformas de la β_2 GPI y con los anticuerpos IgG purificados. Como se observa en la figura 8, se encontró un incremento en la expresión de CD14, CD11c y HLA-DR cuando se estimularon con los complejos de anticuerpos con dp β_2 GPI o dc β_2 GPI, mientras que los anticuerpos en presencia de β_2 GPI nativa inducen una leve expresión de los marcadores. Por otro lado, no se encontró expresión de los marcadores en células estimuladas con los anticuerpos solos [Figura 14]

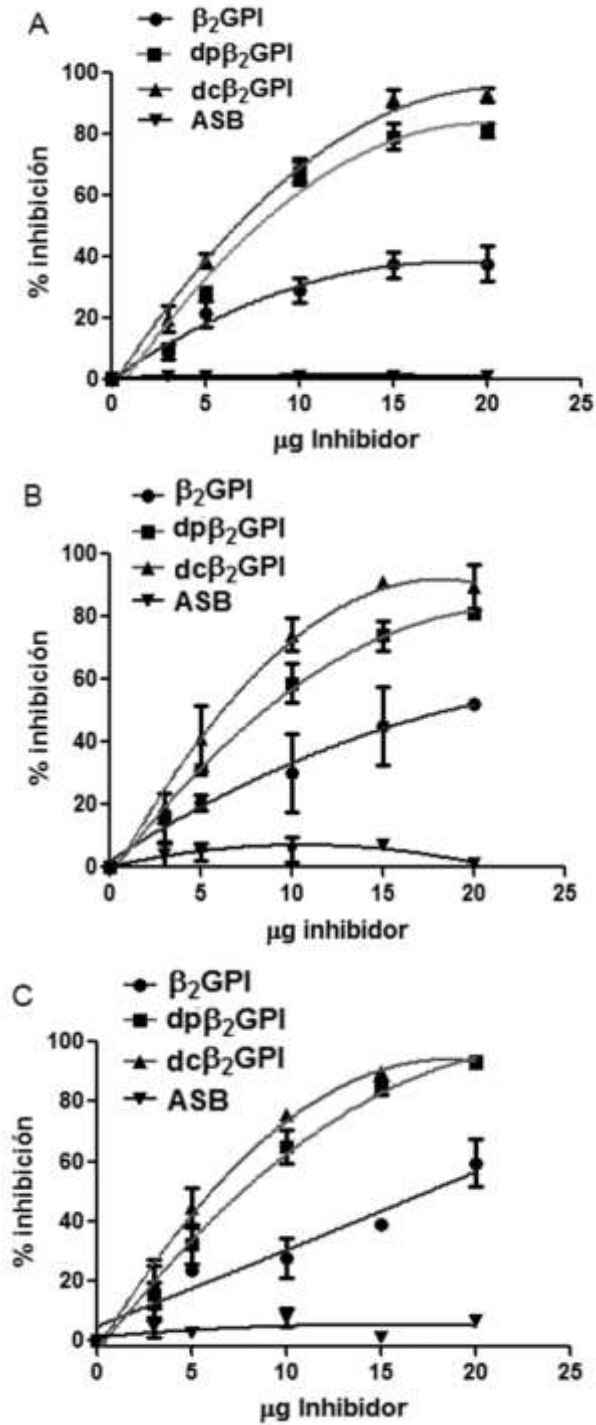


Figura 13. **Ensayos de inhibición.** Ensayos de inhibición de anticuerpos IgG anti-β₂GPI de pacientes con SaFP usando β₂GPI nativa (●), dpβ₂GPI (■), dcβ₂GPI (▲) y ASB como control (▼) como inhibidores en placas no irradiadas, sensibilizadas con A) β₂GPI nativa, B) dpβ₂GPI y C) dcβ₂GPI. Los resultados son expresados como media ± SEM.

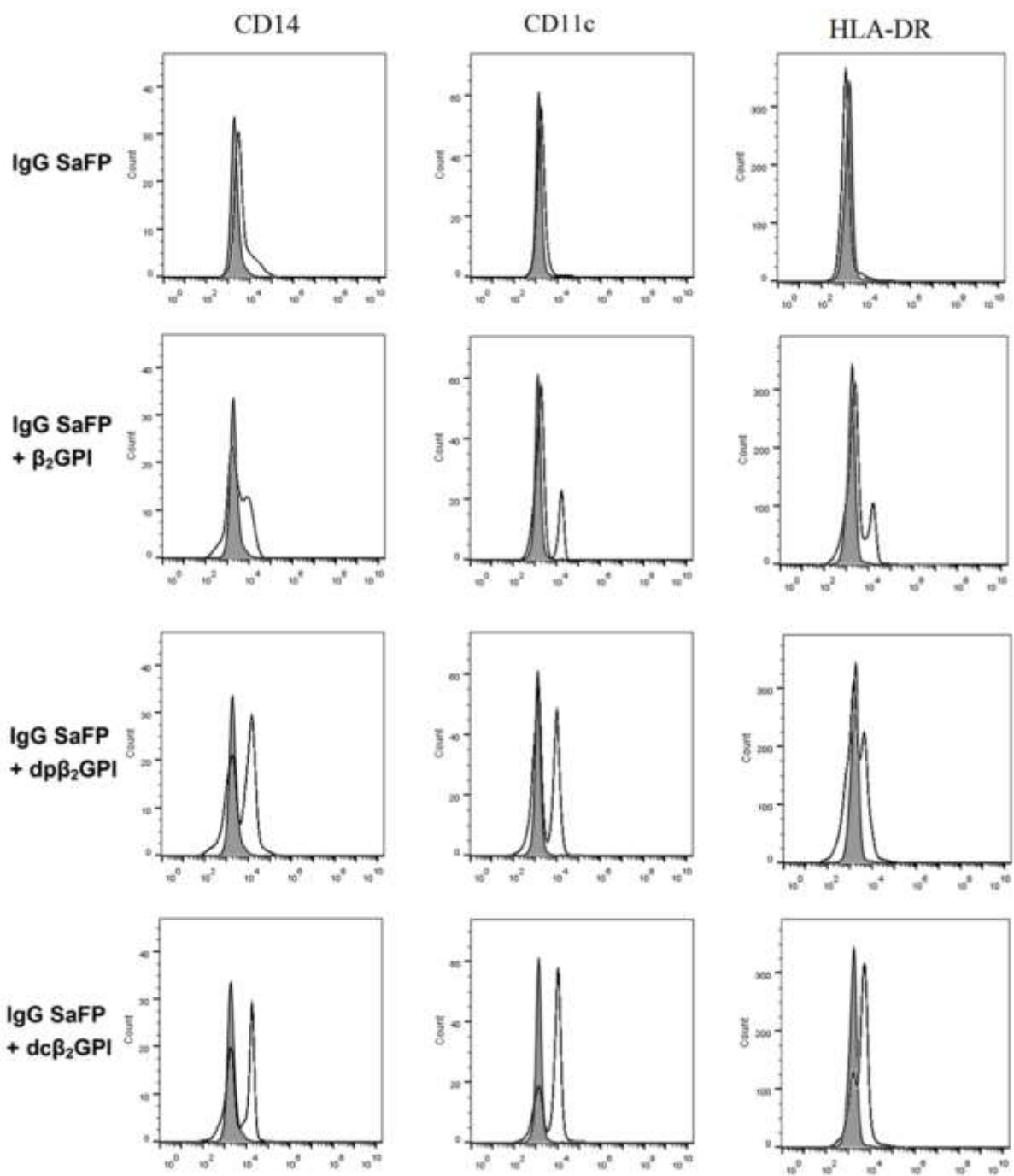


Figura 14. **Expresión de marcadores de superficie en células U937.** Expresión de CD14, CD11c y HLA-DR en células U937 después del estímulo de 6 horas con aFL IgG y los complejos aFL IgG-glicoformas.

6.7 Síntesis de citocinas pro-inflamatorias por las células U937 inducidas por los complejos anticuerpos IgG-glicoformas.

Para determinar si los diferentes complejos de anticuerpos-glicoformas son capaces de inducir la síntesis de citocinas en U937, se realizó un ensayo múltiple de detección. Interesantemente, se observó un incremento en la síntesis de IL-6 e $\text{IFN}\gamma$ comparado con IgG humana en ausencia de $\beta_2\text{GPI}$ humana exógena. Además, se encontró un incremento en la expresión de IL-6, $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ cuando se estimularon las células con el complejo aFL-dc $\beta_2\text{GPI}$ comparado con aFL-dp $\beta_2\text{GPI}$ ($p=0.0247$ para IL-6; $p=0.0238$ para $\text{IFN}\gamma$ y $p=0.016$ para $\text{TNF}\alpha$), aFL- $\beta_2\text{GPI}$ ($p=0.0146$ para IL-6; $p=0.007$ para $\text{IFN}\gamma$ y 0.0007 para $\text{TNF}\alpha$) y aFL ($p=0.0102$ para IL-6; $p=0.0065$ para $\text{IFN}\gamma$ y 0.0024 para $\text{TNF}\alpha$). Por otro lado, no se encontró expresión de IL-4 en los cultivos estimulados con los distintos complejos aFL-glicoformas [Figura 15]

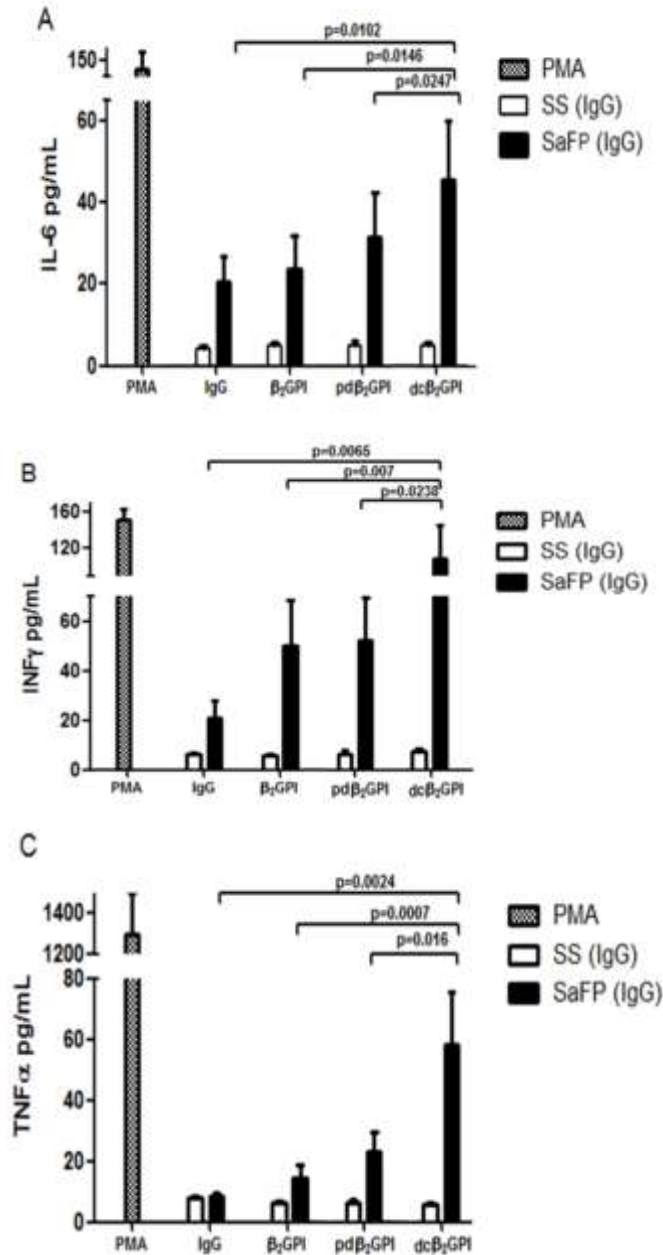


Figura 15. **Expresión de citocinas en sobrenadantes de cultivos U937.** Concentración de citocinas pro-inflamatorias en sobrenadantes de cultivos de células U937 después de 6 horas de estímulo con IgG aFL-glicofomas de la β_2 GPI y PMA como control de 11 pacientes con SaFP (barra negra) y 10 sujetos sanos (barra blanca). A) IL-6, B) IFN γ y C) TNF α . La síntesis basal de las tres citocinas fue menor al límite de detección (<3.2pg/mL). Los resultados son expresados como media \pm SEM, valores $p < 0.05$ fueron tomados como significativos.

7. Discusión

Diversos grupos han demostrado que la unión de β_2 GPI a superficies de carga negativa o membrana celulares inducen un cambio conformacional en la β_2 GPI, que pasa de una forma circular a una forma *J*, permite la exposición de epítomos crípticos con la subsecuente reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI^{42,58,87,88}. El principal epítomo críptico reportado por su fuerte asociación con trombosis en pacientes con SaF es el G₄₀-R₄₃ que se encuentra en el dominio I^{41,62,89}.

En el presente estudio se encontró que la remoción del ácido siálico de la β_2 GPI es suficiente para aumentar la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI comparada con la β_2 GPI nativa. Este hallazgo se podría complementar con el trabajo reportado por *Kondo et al.* donde encuentran que algunos pacientes con SaF presentan una disminución en el ácido siálico de la N₁₄₃ en la cadena de carbohidratos de la β_2 GPI⁹⁰ y explicar la reactividad de los anticuerpos anti- β_2 GPI contra β_2 GPI desialidada anormalmente *in vivo*. Además, se encontró un mayor incremento en la reactividad después de remover completamente la cadena de carbohidratos de la β_2 GPI, siendo consistente con lo reportado por *de Laat et al.*⁶².

Por otra parte, se encontró que las glicofomas de la β_2 GPI presentan de aproximadamente el doble la capacidad inhibitoria de los anticuerpos IgG comparada con la β_2 GPI nativa en fase soluble. Además, la β_2 GPI nativa en condiciones *in vitro* es capaz de inhibir a los anticuerpos IgG de manera dosis-respuesta, lo que es consistente con la hipótesis que anteriormente nuestro grupo

de investigación propuso; que es la posible existencia de epítomos crípticos y no crípticos en la β_2 GPI²⁹.

También, se encontró que los carbohidratos son un factor determinante en la conformación de la β_2 GPI ya que a pesar de los cambios drásticos en sus propiedades espectrales la $dc\beta_2$ GPI, lo que sugiere que la remoción de los carbohidratos permite la exposición de residuos de triptófano al medio, no se observa afectación en su plegamiento, debido a la similitud que presenta el barrido térmico comparada con la β_2 GPI nativa. Siendo este resultado consistente con el patrón obtenido por *Walsh et al.* donde observan que los carbohidratos son necesarios para la conformación tridimensional de la β_2 GPI⁹¹, aunque en el trabajo de *Walsh* propone que la eliminación de los carbohidratos afecta la actividad biológica de la glicoproteína, nosotros diferimos en su propuesta, ya que los resultados que se muestran en el presente trabajo, se encontró reconocimiento por parte de los aFL contra la β_2 GPI desglucosilada parcial y totalmente y además este reconocimiento permite la interacción con membranas celulares.

Al estudiar si los carbohidratos influyen en la activación celular, se encontró inducción de la diferenciación de células U937 a monocitos mediante la estimulación con IgG de pacientes con SaF en presencia de β_2 GPI nativa y sus glicofomas. Además, se encontró incremento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias principalmente IL-6, IFN γ y TNF α , cuando las células U937 fueron pre-incubadas con $cd\beta_2$ GPI comparada con $pd\beta_2$ GPI y β_2 GPI nativa. Estos datos sugieren que los cambios conformacionales adquiridos por la β_2 GPI después de la desglucosilación completa le permiten un mejor anclaje a las membranas celulares

con un posterior reconocimiento de los anticuerpos anti- β_2 GPI. Interesantemente, las IgG de pacientes con SaF son capaces de estimular la producción de citocinas comparada con las IgG de sujetos sanos en ausencia de β_2 GPI endógena. Debido a que las células fueron incubadas con medio libre de suero dos horas antes de la adición de IgG y que ninguna de las glicofomas de la β_2 GPI utilizadas en los experimentos *in vitro* tienen actividad biológica intrínseca, lo que sugiere que la actividad pro-inflamatoria es resultado de la reactividad de los anticuerpos IgG de pacientes contra SaF contra β_2 GPI, aunque hay que considerar que los monocitos son capaces de sintetizar β_2 GPI y FT en ciertas condiciones de LEG y SaFP^{78,92}, por lo que implica que es necesario realizar estudios para conocer si los monocitos diferenciados a partir de las células U937 son capaces de sintetizar β_2 GPI, además de estudiar la vía por la cual se activan las células U937 y si se obtiene el mismo efecto de activación en monocitos de pacientes con SaF.

8. Conclusiones

1. Las cadenas de carbohidratos cubren epítomos críticos en la β_2 GPI que son expuestos cuando se une a componentes de carga negativa.
2. La eliminación del ácido siálico en las cadenas de carbohidratos es suficiente para permitir el reconocimiento de los anticuerpos anti- β_2 GPI a la β_2 GPI en fase soluble
3. El complejo FL/glicofomas/anticuerpos generado en las membranas celulares son capaces de diferenciar las células U937 a monocitos y permiten la expresión de citocinas pro-inflamatorias en los monocitos diferenciados.

9. Bibliografía

1. Levine JS, Branch DW, Rauch J. **The antiphospholipid syndrome.** *N Eng J Med.* 2002; **346**:752-63
2. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Faulk WP. **Antiphospholipid antibodies: discovery, definitions, detection and disease.** *Prog Lipid Res.* 2003; **42**: 176-237
3. Conley CL, Hartman RC. **A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus.** *J Clin Invest.* 1952; **31**: 621-2
4. Laurell A, Nilsson I. **Hypergammaglobulinemia and biological false positive Wassermann reaction: a study of two cases.** *J Lab Clin Med.* 1957; **49**: 694
5. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S. **Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus.** *Lancet.* 1983; **2**: 1211-4
6. Harris EN, Ghavari AE, Wasley GD, Hughes GR. **Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and of inhibition studies to distinguish between**

-
- antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disorders. *J Infect Dis.*1988; **157**: 23-31**
7. Hughes GRV. **Hughes syndrome (the antiphospholipid syndrome) ten clinical lessons.** *Autoimmun Rev.* 2008; **7**: 262-6
8. Alarcón-Segóvia D, Sanchez-Guerrero J. **Primary antiphospholipid syndrome.** *J Rheumatol.* 1989; **16**: 482-8
9. Galli M, Barbui T. **Antiphospholipid antibodies and pregnancy.** *Best Prac Res Clin Haematol.* 2003; **16**: 211-25
- 10.Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHWM, de Groot PG, Koike T, Meroni L, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. **International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS).** *J Thromb Haemos.* 2006; **4**: 295-306
- 11.Shoenfeld Y, Meroni PL, Toubi E. **Antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: are they separate entities or just clinical presentations on the same scale?** *Curr Opin Rheumatol.* 2009; **21**: 495-500
- 12.Passam FH, Krilis. **Laboratory test for the antiphospholipid syndrome: current concepts.** *Pathology.* 2004; **36**: 129-38

-
13. Horstman LL, Jy W, Bidot CJ, Ahn YS, Kelley RE, Zivadinov R, Maghzi AH, Etemadifar, Mousavi SA, Minagar A. **Antiphospholipid antibodies: paradigm in transition.** *J Neuroinflamm.* 2009; **6**: 3-24
14. Alessandri C, Conti F, Pendolino M, Mancini R, Valessini G. **New autoantigens in the antiphospholipid syndrome.** *Autoimmun Rev.* 2011; **10**:609-616
15. Espinosa G, Cervera R, Font J, Shoenfeld Y. **Antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms.** *Autoimmun review.* 2003; **2**: 86-93
16. Sen ES, Beresford MW, Avcin T, Ramanan AV. **How to use... lupus anticoagulants.** *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013; **98**: 52-7
17. Feinstein DI, Rapaport SI. **Acquired inhibitors of blood coagulation.** *Prog Hemost Thromb.* 1972; **1**: 75-95
18. Nilsson IM, Astedt B, Hedner U, Berezine D. **Intrauterine death and circulation anticoagulant "antithromboplastin".** *Acta Med Scand.* 1975; **197**: 153-9
19. Rauch J. **Lupus anticoagulant antibodies: recognition of phospholipids-binding protein complex.** *Lupus.* 1998; **7**: S29-S31

-
20. Nilsson IM, Astedt B, Hedner U, Berezine D. **Intrauterine death and circulation anticoagulant “antithromboplastin”**. *Acta Med Scand.* 1975; **197**: 153-9
21. Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. **A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioral patterns**. *Br J Haematol.* 1978; **40**: 151
22. Oosting JD, Derksen RHW, Entjes HT, Bouma BN, de Groot PG. **Lupus anticoagulant activity is frequently depend on the presence of beta 2-glycoprotein I**. *Thromb Haemost.* 1992; **67**: 499-502
23. Roubey RAS, Pratt CW, Buyon JP, Windfield JB. **Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon β 2glycoprotein I**. *J Clin Invest.* 1992; **90**: 1100-4
24. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. **Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin**. *Thromb Haemost.* 1991; **66**: 629-32
25. Amengual O, Atsumi T, Koike T. **Antiprothrombina antibodies and diagnosis of antiphospholipid syndrome**. *Clin Immunol.* 2004; **112**: 144-9

-
26. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. **Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor.** *J Immunol.* 1992; **148**: 3885-91
27. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. **Detection of anticardiolipin antibodies in heat-inactivated normal human sera is not influenced by beta 2-glycoprotein-I.** *Thromb Res.* 1993; **72**: 471-2
28. Galli M, Comfurius P, Maasen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesmen PJC, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers. **Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor.** *Lancet.* 1990; **335**: 1544-7
29. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. **Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associated more strongly with anti-beta 2-glycoprotein-I than with antiphospholipid antibodies.** *J Rheumatol.* 1995; **22**: 1899-906
30. Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Yasuda T, Koike T. **Molecular definition of human β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI) by cDNA cloning and inter-species differences of β_2 GPI in alteration of anticardiolipin binding.** *Int Immunol.* 1991; **3**: 1217-21
31. Lozier J, Takahashi N, Putman FW. **Complete amino acid sequence of human plasma β_2 -glycoprotein I.** *Proc Natl Acad Sci.* 1984; **81**: 3640-4

-
32. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. **Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease.** *Thromb Res.* 2004; **114**: 335-46
33. Agar C, de Groot PG, Levels JHM, Marquart JA, Meijers JCM. **B₂-Glycoprotein I is incorrectly named apolipoprotein H.** *J Thromb Haemost.* 2009; **7**: 235-6
34. Alvarado C, Bahena S, Llorente L, Martínez-Castillo A, Alarcón-Segovia D, Cabral AR. **B₂-Glycoprotein-I mRNA transcripts are expressed by hepatocytes but not by resting or activated human endothelial cells.** *Thromb Res.* 1998; **90**: 239-43
35. Chamley W, Allen JL, Johnson PM. **Synthesis of beta2 glycoprotein 1 by human placenta.** *Placenta.* 1997; **18**: 403-10
36. Puurunen M, Jokiranta S, Vaarala O, Meri S. **Lack of functional similarity between complement factor H and anticardiolipin cofactor, beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H).** *Scand J Immunol.* 1995; **42**: 547-50.
37. Bouma B, de Groot PG, van den Else JMH, Ravelli RGB, Schouten A, Smmelink MJA, Derksen RHWM, Kroon J, Gros P. **Adhesion mechanism of human β_2 -glycoprotein I to phospholipid based on its crystal structure.** *EMBO J.* 1999; **18**: 5166-74

-
38. Kertesz Z, Yu B, Steinkasserer A, Haupt H, Benham A, Sim RB. **Characterization of binding of human β_2 -glycoprotein I to cardiolipin.** *Biochem J.* 1995; **310**: 315-21
39. Gambino R, Ruiu G, Pagano G, Cassader M. **Qualitative Analysis of the carbohydrate composition of apolipoprotein H.** *J Prot Chem.* 1997; **16**: 205-12.
40. Brighton T, Dai Y, Hogg PJ, Chesterman CN. **Microheterogeneity of beta-2 glycoprotein I: implications for binding to phospholipids.** *Biochem J.* 1999; **340**: 59-67
41. Agar C, van Os GMA, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, Derksen RHW, Meijers JCM, de Groot PG. **β_2 Glycoprotein I can exist in two conformations: implications for recognition in the antiphospholipid syndrome.** *Blood.* 2010; **116**: 1336-43
42. Wang S, Sun Y, Sui S. **Membrane-induced conformational change in human apolipoprotein H.** *Biochem J.* 2000; **348**: 103-6
43. Gamsjaeger R, Johs A, Gries A, Gruber HJ, Romanin C, Prassl R, Hinterdorfer P. **Membrane binding of β_2 -glycoprotein I can be described by a two-state reaction model: an atomic force microscopy and surface plasmon resonance study.** *Biochem J.* 2005; **389**: 665-73

-
44. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T. **β_2 -glycoprotein I, anti- β_2 -glycoprotein I and fibrinolysis.** *Thromb Res.* 2004; **114**: 461-5
45. Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. **Identification of a region of β_2 -glycoprotein I critical lipid binding and anticardiolipin antibody cofactor activity.** *Proc Natl Acad Sci.* 1993; **90**: 2141-5
46. Nomura S, Fukuhara S, Komiyama Y, Takahashi H, Matsuura E, Nakagaki T, Funatsu A, Sugo T, Matsuda M, Koike T. **Beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibody influence factor Xa generation but not factor Xa binding to platelet-derived microparticles.** *Thromb Haemost.* 1994; **71**: 526-7
47. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, Kato H, Tanaka H, Yamakado M, Akino M, Saitou H, Amasaki Y, Jodo S, Amengual O, Koike T. **Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis.** *Blood.* 2004; **103**: 3766-72
48. Itoh Y, Inuzuka K, Kohno I, Wada H, Shiku H, Ohkura N, Kato H. **Highly increased plasma concentrations of nicked form of beta(2) glycoprotein I in patients with leukemia and with lupus anticoagulant: measurement with a monoclonal antibody specific for a nicked form of domain V.** *J Biochem.* 2000; **128**: 1017-24

-
49. Schousbe I, Rasmussen MS. **Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of factor XII in plasma by beta 2-glycoprotein I and anti-beta 2-glycoprotein I.** *Thromb Haemost.* 1995; **73**: 798-804
50. Shi W, Chong BH, Hogg PJ, Chesterman CN. **Anticardiolipin antibodies block the inhibition by β_2 -glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets.** *Thromb Haemost.* 1993; **70**: 342-5
51. Shi T, Iverson GM, Qi JC, Cockerill KA, Linnik MD, Konecny P, Krilis SA. **Beta 2-glycoprotein I bind factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I.** *Proc Natl Acad Sci.* 2004; **101**: 3939-44
52. Rahgozar S, Yang Q, Giannakopoulos B, Yan X, Miyakis S, Krilis SA. **Beta2-glycoprotein I binds thrombin via exosite I and exosite II: anti-beta2-glycoprotein I antibodies potentiate the inhibitory effect of beta2-glycoprotein I on thrombin-mediated factor Xa generation.** *Arthritis Rheum.* 2007; **56**: 605-13
53. Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K, Koike T. **Beta2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies.** *Arthritis Rheum.* 1999; **42**: 167-74
54. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. **Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes as**

-
- lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -Glycoprotein I (apolipoprotein H).** *Proc Natl Acad Sci.* 1990; **87**: 4120-4
55. Koike T, Matsuura AE. **What is the “true” antigen for antiphospholipid antibodies?** *Lancet.* 1990; **337**: 671-2
56. Giannakopoulos B, Krilis SA. **The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome.** *New Eng J Med.* 2013; **368**: 1033-44
57. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. **Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface.** *J Exp Med.* 1994; **179**: 457-62
58. Chamley LW, Duncalf AM, Konarkowska B, Mitchell MD, Johnson PM. **Conformationally altered beta 2-glycoprotein I is the antigen for anti-cardiolipin autoantibodies.** *Clin Exp Immunol.* 1999; **115**: 571-6
59. Roubey RAS, Einsenberg RA, Harper MF, Winfield JB. **“anticardiolipin” autoantibodies recognize beta2-glycoprotein I in the absence of phospholipid importance of Ag density and bivalent binding.** *J Immunol.* 1995; **154**: 954-60
60. Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA, Koike T. **Human β_2 -glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined**

-
- using deleted mutants expressed by baculovirus system. *Blood*. 1996; **87**: 3262-70
61. Giles IP, Isenberg DA, Latchman DS, Rahman A. **How do antiphospholipid antibodies bind β_2 -glycoprotein I?** *Arthritis Rheum*. 2003; **48**: 2111-21
62. de Laat B, Derksen RHW, van Lummel M, Pennings TT, de Groot PG. **Pathogenic anti- β_2 -glycoprotein I antibodies recognize domain I of β_2 -glycoprotein I only after a conformational change.** *Blood*. 2006; **107**: 1916-24
63. Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM. **Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI.** *Proc Natl Acad Sci*. 1998; **95**: 15542-6
64. Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A. **Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43.** *Arthritis Rheum*. 2007; **56**: 280-90
65. Iverson GM, Reddel S, Victoria EJ, Cockerill KA, Wang YX, Mati-Renom MA, Sali A, Marquis DM, Krilis SA, Linnik MD. **Use of single point mutations in domain I of beta 2-glycoprotein I to determine fine antigenic specificity of antiphospholipid antibodies.** *J Immunol*. 2002; **169**: 7097-103

-
66. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE, Ruffatti A, Rozman B, Kveder T, de Moerloos P, Boehlen F, Rand J, Ulcova-Gallova Z, Mertens K, de Groot PG. **The association circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study.** *J Thromb haemost.* 2009; **7**: 1767-73
67. Pelkmans L, de Laat B. **Antibodies against domain I of β_2 -glycoprotein I: the one and only?** *Lupus.* 2012; **21**: 760-72
68. Sanghera DK, Kristensen T, Hamman RF, Kamboh MI. **Molecular basis of the apolipoprotein H (β_2 glycoprotein I) protein polymorphism.** *Human Gen.* 1997; **100**: 57-62
69. Hirose N, Williams R, Alberts AR, Furie RA, Chastash EK, Jain RI, Sison C, Lahita RG, Merrill JT, Cucurull E, Ghavari AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Hashimoto S, Sawada T, Chu CC, Gregersen PK, Chiorazzi N. **A role for the polymorphism at position 247 of the β_2 -glycoprotein I gene in the generation of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in the antiphospholipid syndrome.** *Arthritis Rheum.* 1999; **42**: 1655-61
70. Atsumi T, Tsutsumi A, Amengual O, Khamashta MA, Hughes G, Miyosi Y. **Correlation between β_2 -glycoprotein I valine/leucine²⁴⁷ polymorphism and anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome.** *Rheumatology.* 1999; **38**: 721-3

-
71. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. **Significance of Valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β_2 -glycoprotein I in antiphospholipid syndrome.** *Arthritis Rheum.* 2005; **52**: 212-218
72. Prieto GA, Cabral AR, Zapata-Zuñiga M, Simon AJ, Villa AR, Alarcón-Segovia D, Cabiedes J. **Valina/valina genotype at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies.** *Arthritis Rheum.* 2003; **48**: 471-4
73. Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN. **Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin.** *Circ Res.* 2001; **88**: 245-50
74. Ma K, Simantov R, Zhang JC, Silverstein R, Hajjar KA, McGrae KR. **High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II.** *J Biol Chem.* 2000; **275**: 15541-8
75. Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, Willard B, Zhang J, McGrae KR. **A novel Pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β_2 -glycoprotein I antibodies.** *Blood.* 2012; **119**: 884-93

-
76. Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, Meroni PL. **Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies.** *Blood.* 2003; **101**: 3495-500
77. Sorice M, Longo A, Capozzi A, Garofalo T, Misasi R, Alessandri C, Conti F, Buttari B, Riganò R, Ortona E, Valesini G. **Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies induce release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathway involving lipid rafts.** *Arthritis Rheum.* 2007; **56**: 2687-97
78. Satta N, Kruithof EK, Fickentscher C, Dunoyer-Geindre S, Boehlen F, Reber G, Burger D, de Moerloose P. **Toll-like receptor 2 mediates the activation of human monocytes and endothelial cells by antiphospholipid antibodies.** *Blood.* 2011; **117**: 5523-31
79. Vlachoyiannopoulos PG, Mauragani CP, Bourazopoulou E, Balistari AV, Routsias J. **Anti-CD40 antibodies in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus.** *Thromb Haemost.* 2004; **92**: 1303-11
80. Lutters BCH, Derksen RHW, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. **Dimers of β_2 -glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipid and the apolipoprotein E receptor 2.** *J Biol Chem.* 2003; **278**: 33831-8

-
81. Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, Yu P, Berndt MC, Andrew RK, Rivera J, Iverson M, Cockerill KA, Linnik MD, Krilis SA. **Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in complex with β_2 -glycoprotein I can activate platelets in dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V.** *Arthritis Rheum.* 2006; **54**: 2558-67
82. Canobbio I, Balduini C, Torti M. **Signaling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex.** *Cell Signal.* 2004; **16**: 1329-44
83. Stone S, Pijnenborg R, Vercruysse L, Poston R, Khamashta MA, Hunt BJ, Poston L. **The placental bed in pregnancies complicated by primary antiphospholipid syndrome.** *Placenta.* 2006; **27**: 457-66
84. Di Simone N, Raschi E, Testoni C, Castellani R, D'Asta M, Shi T, Krilis SA, Caruso A, Moroni PL. **Pathogenic role anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in antiphospholipid associated fetal loss: characterization of β_2 -glycoprotein I binding to trophoblast cells and functional effects of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in vitro.** *Ann Rheum Dis.* 2005; **64**: 462-7
85. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. **Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus.** *Sem Arthritis Rheum.* . 1992; **21**: 275-86

-
86. Schousboe I. **β_2 -glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway.** *Blood*. 1985; **66**: 1086-1091
87. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero. **Phospholipid specificity and requirement of β_2 -glycoprotein I for reactivity of antibodies from patients with primary antiphospholipid syndrome.** *J Autoimmunity*. 1992; **5**: 787-801
88. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. **Heterogeneity of antibodies to beta2-glycoprotein 1 from patients with systemic lupus erythematosus.** *Lupus*. 2004; **13**: 182-7
89. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. **IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis.** *Blood*. 2005; **105**: 1540-5
90. Kondo A, Miyamoto T, Yonekawa O, Giessing AM, Osterlund EC, Jensen ON. **Glycopeptide profiling of beta-2-glycoprotein I by mass spectrometry reveals attenuated sialylation in patients with antiphospholipid syndrome.** *J Proteomic*. 2009; **73**: 123-133
91. Walsh MT, Watzlawick H, Putman FW, Schmid K, Brossmer R. **Effect of the carbohydrate moiety on the secondary structure of β_2 glycoprotein**

I. Implications for the biosynthesis and folding of glycoproteins.

Biochemistry. 1990; **29**: 6250-7

92. Conti F, Sorice M, Circella A, Alessandri C, Pittoni V, Caronti B, Calderaro C, Griggi T, Misasi R, Valesini G. **Beta-2-glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and correlates with tissue factor expression.** *Clin Exp Immunol*. 2003; **132**: 509-16

93. Koike T, Ichikawa K, Kasahara H, Atsumi T, Tsutsumi A, Matsuura E. **Epitopes on beta2-GPI recognized by anticardiolipin antibodies.** *Lupus*. 1998; **7** Suppl 2: S14-7