



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGIA**

**Estandarización de un método de detección para anticuerpos anti-DI $\beta$ 2-GPI en pacientes con SAFP**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**VIRIDIANA GUADALUPE ESPINOSA MOYA**



**DIRECTOR DE LA TESIS: DR. DIEGO FRANCISCO  
HERNÁNDEZ RAMÍREZ**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2021**



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.

Gracias a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por darme la oportunidad de pertenecer a tan gran institución

Gracias al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por permitirme desarrollar como profesional

Gracias a mi comité tutorial

Expreso mi agradecimiento profundo al Dr. Diego Hernández, por todas sus enseñanzas y consejos a lo largo de mi desarrollo académico, además de su apoyo incondicional

Al Dr. Carlos Núñez, por sus valiosos consejos y apoyo que me permitieron desarrollarme profesional y personalmente

A la Q.F.B. Patricia Vidal por sus enseñanzas, dedicación y consejos que me han formado como profesional y por extensión como persona

Al laboratorio de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ por siempre estar presentes y darme aliento en mi formación

A mi hijo, por su paciencia y comprensión que me ha demostrado que el verdadero amor no es otra cosa más que el deseo de ayudar a otro para que se supere

A mi madre por su apoyo y comprensión a lo largo de mi vida, sin ti nada sería posible

A mis abuelos por su amor y confianza, que me han permitido alcanzar cada una de mis metas

A mi hermana Diana, por hacerme más alegre este camino

A mi familia, por todos los buenos momentos, su apoyo y compañía en cada uno de mis pasos

A Antonio, por tu apoyo incondicional, por los gratos momentos que hemos pasado, que la vida nos permita más

A Waikiki Tamure por enseñarme a sostener mis sueños con fuerza

A Mary, Rogelio y Braulio por sus consejos y su amistad sincera

*“‘a’ohe pau ka ‘ike I ka hālau ho’okahi “*

*La totalidad del conocimiento no se enseña en una única escuela*

*Proverbio hawaiano*

## **Resumen**

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) es una enfermedad autoinmune multifactorial, caracterizada principalmente por la presencia de eventos trombóticos venosos y/o arteriales y pérdidas fetales, asociadas a la presencia de autoanticuerpos circulantes, denominados anticuerpos antifosfolípidos (aFL). Diversos estudios han demostrado que la  $\beta_2$ -Glicoproteína I ( $\beta_2$ -GPI) es uno de los principales antígenos, siendo el Dominio I (DI) uno de los blancos primordiales, estos anticuerpos (anti-DI [aDI- $\beta_2$ GPI]) se presentan hasta en un 58% en pacientes con SAF, es por ello que, se ha planteado la posibilidad de incluirlos en los criterios para el diagnóstico de SAF. Por esto, en el presente trabajo desarrollamos y estandarizamos un método de detección de aDI- $\beta_2$ GPI, mediante un ELISA casero, que permitirá realizar estudios de la importancia de estos anticuerpos en población mexicana.

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| <b>Introducción</b> .....   | 8  |
| <b>Marco Teórico</b> .....  | 9  |
| <b>Historia</b> .....   | 9  |
| <b>Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos</b> .....             | 11 |
| <b>Anticuerpos antifosfolípidos</b> .....                         | 14 |
| <b><math>\beta_2</math>-Glicoproteína-I</b> .....                 | 14 |
| <b>Anticuerpos anticardiolipina</b> .....                         | 17 |
| <b>Anticuerpos anti<math>\beta_2</math>-Glicoproteína I</b> ..... | 17 |
| <b>Anticuerpos anti-Dominio I</b> .....                           | 18 |
| <b>Anticoagulante lúpico</b> .....                                | 23 |
| <b>Otros anticuerpos asociados a SAF</b> .....                    | 24 |
| <b>Planteamiento del problema</b> .....                           | 25 |
| <b>Pregunta de Investigación</b> .....                            | 25 |
| <b>Hipótesis</b> .....  | 25 |
| <b>Objetivos</b> .....  | 25 |
| <b>Material y métodos</b> .....                                   | 26 |
| <b>Diseño de estudio</b> .....                                    | 26 |
| <b>Universo</b> .....   | 26 |
| <b>Sujetos sanos</b> .....  | 26 |
| <b>Pacientes</b> .....  | 26 |
| <b>Variables</b> .....  | 26 |
| <b>Técnicas</b> .....   | 27 |
| <b>Procedimiento</b> .....  | 27 |
| <b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....            | 27 |
| <b>Expresión de proteína en bacterias HB-DI</b> .....             | 28 |
| <b>Tinción de plata</b> .....                                     | 29 |
| <b>Identificación del DI</b> .....                                | 29 |
| <b>Electroinmunotransferencia</b> .....                           | 29 |
| <b>Purificación del DI</b> .....                                  | 30 |
| <b>Electroelución pasiva</b> .....                                | 30 |
| <b>Estandarización del ELISA</b> .....                            | 30 |
| <b>Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)</b> .....   | 31 |
| <b>Análisis estadístico</b> .....                                 | 31 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Resultados</b> .....  | 32 |
| <b>Sujetos sanos</b> .....   | 32 |
| <b>Estandarización de ELISA para anticuerpos aDI-<math>\beta</math><sub>2</sub>GPI</b> ..... | 33 |
| <b>La estandarización de la curva 4PL</b> .....  | 35 |
| <b>Discusión</b> .....   | 47 |
| <b>Conclusiones</b> .....  | 51 |
| <b>Referencias</b> .....   | 52 |

## Abreviaturas

|                      |   |
|----------------------|---|
| SAF                  | Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos                                  |
| aCL                  | Anticuerpos anticardiolipinas   |
| ADP                  | Adenosín-difosfato  |
| aFL                  | Anticuerpos antifosfolípidos  |
| AgNO <sub>3</sub>    | Nitrato de plata  |
| AL                   | Anticoagulante lúpico   |
| aPS/PT               | Anticuerpos antifosfatidilserina/protrombina                              |
| ARNm                 | Ácido ribonucleico mensajero  |
| aβ <sub>2</sub> -GPI | Anticuerpos anti-β <sub>2</sub> -Glicoproteína-I                          |
| BrEt                 | Bromuro de etidio   |
| CL                   | Cardiolipina  |
| DI                   | Dominio I   |
| dRVVT                | Tiempo del Veneno de víbora diluido de Russel                             |
| DV                   | Dominio V   |
| ELISA                | Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzimas                                |
| FL                   | Fosfolípidos  |
| INCMNSZ              | Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán       |
| IPTG                 | Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido                                      |
| KPTT                 | Tromboplastina Parcial Activada con Kaolín                                |
| LDL                  | Lipoproteínas de baja densidad  |
| LEG                  | Lupus eritematoso generalizado  |
| LPS                  | Lipopolisacárido  |
| LRP8                 | Receptor de proteínas de baja densidad relacionados a la proteína 8       |
| MAPK                 | Proteína quinasa activada por mitógenos                                   |
| NaOH                 | Hidróxido de sodio  |
| NF – κB              | Factor nuclear- kb  |
| NH <sub>4</sub> OH   | Hidróxido de amonio   |
| PAGE                 | Electroforesis en gel de poliacrilamida                                   |
| PCR                  | Reacción en cadena de la polimerasa                                       |
| PRC                  | Proteínas reguladoras del complemento                                     |
| ROC                  | <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i> , por sus siglas en ingles |
| SAFP                 | Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario                         |
| SAFS                 | Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario                       |
| TLR                  | Receptor tipo Toll  |
| TTPa                 | Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada                                 |
| VDRL                 | <i>Veneral Disease Research Laboratory</i> , por sus siglas en ingles     |
| β <sub>2</sub> -GPI  | β <sub>2</sub> -Glicoproteína-I   |



## Introducción

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) es una enfermedad autoinmune multifactorial, caracterizada por la presencia de eventos tromboticos venosos y/o arteriales, pérdidas fetales, *livedo reticularis*, enfermedad vascular, enfermedades neurológicas no tromboticas y trombocitopenia; asociadas con la presencia de autoanticuerpos circulantes en sangre periférica, denominados anticuerpos antifosfolípidos (aFL). Los principales aFL presentes en el SAF son: Anticuerpos anticardiolipinas (aCL), anticoagulante lúpico (AL) y anti- $\beta_2$ -Glicoproteína-I ( $a\beta_2$ -GPI). Siendo la  $\beta_2$ -Glicoproteína-I ( $\beta_2$ -GPI) uno de los principales antígenos, cuando la  $\beta_2$ -GPI se une a los fosfolípidos (FL) de carga negativa, ocurre un cambio conformacional que expone un epítipo crítico en el dominio I (DI), mismo que se ha asociado fuertemente con eventos tromboticos en pacientes con SAF y que puede servir como un marcador serológico en dichos pacientes. Es por ello que, en el presente trabajo, se desarrolló y estandarizó un ELISA casero de DI recombinante para la detección de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI que permitirá realizar estudios de la importancia de estos anticuerpos en población mexicana.

## Marco Teórico

### Historia

En el siglo XX la sífilis era una enfermedad con alto impacto en el mundo, por lo que múltiples investigaciones estaban enfocadas en el diagnóstico de la misma, una de ellas estuvo dirigida por Wassermann y colaboradores, en 1906, donde desarrollaron una reacción serológica para el diagnóstico de sífilis utilizando tejido rico en lípidos como antígeno, proveniente de pacientes con sífilis, a la que se le nombró “prueba de reagina de Wasserman”, conocida hoy como VDRL (por sus siglas en inglés de *Veneral Disease Research Laboratory*)<sup>1,2</sup>. Sin embargo, los estudios siguientes se realizaron en tejido bovino, lo que ameritó investigaciones más detalladas de la prueba. Fue así que, en 1941, cuando M. Pangborn describió un “nuevo” fosfolípido responsable de la actividad antigénica en el extracto de corazón bovino para la detección de sífilis a la que denominó “cardiolipina”.<sup>3</sup> A pesar del éxito en la prueba de reagina de Wasserman para el diagnóstico de sífilis, existía la inquietud de aquellos resultados catalogados como falsos positivos. En 1955 se observó que en los sujetos con “falsos positivos” a sífilis presentaban una anomalía en las globulinas, además los pacientes, en su mayoría mujeres, tenían principalmente Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y/o estaba acompañados de desórdenes hematológicos.<sup>4</sup> En 1963, se observó que algunos pacientes con LEG presentaban eventos trombóticos recurrentes a pesar de tener un inhibidor de la coagulación, denominado años más tarde como “Anticoagulante lúpico” (AL).<sup>2</sup>

Pronto se describió la asociación entre los eventos trombóticos, abortos recurrentes, trombocitopenia y enfermedad neurológica con la presencia de aCL, y se observó que estos anticuerpos aumentaban con la edad.<sup>5</sup> Para 1989, se confirma la asociación entre las manifestaciones clínicas de LEG y los aCL, proponiendo que el SAF se defina bajo estos criterios, así mismo se identificó la disminución en los títulos de aCL durante los episodios trombóticos, lo que indica que se consumen en estos eventos, además se sugirió que el SAF podría o no estar presente con LEG.<sup>6</sup> Al poco tiempo aparecieron los criterios de Alarcón-Segovia definiendo al SAF, con la presencia de dos o más manifestaciones clínicas y al menos un título elevado de aFL y probables en aquellos que posean una manifestación clínica y un título alto de aFL o bien más de dos manifestaciones y un nivel bajo de aFL.<sup>7</sup> Esta definición cambió en 1999 con los Criterios de Sapporo donde se definió al síndrome como la presencia de al menos un criterio clínico y uno de laboratorio, finalmente su última actualización fue en 2006 (criterios de Sídney) donde se agregaron los anticuerpos a $\beta$ <sub>2</sub>-GPI (Tabla 1).<sup>8,9</sup>

## **Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos**

El SAF es una enfermedad autoinmune multifactorial, de etiología desconocida, caracterizada principalmente por la presencia de eventos tromboticos venosos y/o arteriales y perdidas fetales, asociadas a la presencia de autoanticuerpos circulantes, denominados aFL.<sup>8,10-14</sup> Sin embargo existen otras manifestaciones clínicas que pueden presentarse como:<sup>8, 9, 14, 15</sup>

- Cerebrovasculares: Isquemia cerebrovascular, trombosis del seno venoso, corea, migraña, mielopatía transversa, convulsiones, síndrome de *Sneddon*, demencia por infarto múltiple, trombosis retinal venosa, psicosis y síntomas similares a esclerosis múltiple.
- Cardiacas: Enfermedad vascular, endocarditis de *Libman-Sachs*, Enfermedad de la arteria coronaria, cardiomiopatía y trombosis intracardiaca.
- Pulmonares: Embolia e hipertensión pulmonar, hemorragia intra-alveolar, alveolitis fibrosante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto.
- Renales: Trombosis de la vena y/o arteria renal y glomerular, atrofia cortical.
- Sistema Endocrino: Enfermedad de Addison e hipopituitarismo.
- Manifestaciones hematológicas: Trombocitopenia, anemia hemolítica autoinmune, sangrados.
- Gastrointestinales: Síndrome de *Budd-Chiari*, Necrosis esofágica, Isquemia intestinal, necrosis hepática.
- Manifestaciones en la piel: *Livedo reticularis*, úlceras en la piel, necrosis cutánea, gangrena digital y hemorragias en uñas.

El SAF es más frecuente en mujeres que hombres y el riesgo se incrementa con la edad, aproximadamente lo padecen uno de cada seis pacientes menores a 50 años, siendo la causa más común de hipercoagulabilidad, se ha visto que el riesgo aumenta con el uso de anticonceptivos orales.<sup>16,17</sup> Se puede presentar sin evidencia de otra enfermedad autoinmune, a esta condición se le denomina SAF primario (SAFP) o bien asociado a alguna otra enfermedad autoinmune, principalmente el LEG conocido como SAF secundario (SAFS), donde cerca del 40% de pacientes presentan aFL. También, se puede presentar el síndrome de oclusión vascular agudo, que involucra a tres o más órganos, sistemas y/o tejidos de manera simultánea, denominado “SAF catastrófico” y ocurre en menos del 1% de los pacientes, se ha observado que esta condición ocurre posterior a un evento infeccioso en aquellos pacientes con SAFP.<sup>14-16,18-20</sup>

Cuadro 1. Criterios de Sídney para el diagnóstico de SAF

|  |
|--|
| <p>El SAF está presente si se cumplen al menos un criterio clínico y uno de laboratorio.<sup>9</sup></p>   |
| <p><b>Criterios clínicos</b></p> <p>1. Trombosis Vascular</p> <p>Uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o en vasos pequeños, en cualquier tejido u órgano. La trombosis debe ser confirmada por criterios objetivos. (Por ejemplo, encontrar estudios de imagen apropiados o histopatología). Para la confirmación histopatológica, la trombosis debe estar presente con evidencia significativa en los vasos.</p>   |
| <p>2. Morbilidad en el embarazo.</p> <p>(a) Una o más muertes inexplicables del feto morfológicamente normal antes de las 10 semanas de gestación, con morfología fetal normal documentada por ultrasonido o por examinación directa del feto, o</p> <p>(b) Uno o más nacimientos prematuros de un feto normal morfológicamente antes de las 34 semanas de gestación debido a: eclampsia o preclamsia severa definida de acuerdo a los estándares o características reconocidas de insuficiencia placentaria, o</p> <p>(c) Tres o más abortos consecutivos de manera espontánea antes de las 10 semanas de embarazo, con anomalías maternas anatómicas u hormonales y excluidas de causas cromosómicas paternas.</p>   |
| <p><b>Criterios de laboratorio</b></p> <p>1. Anticoagulante lúpico (AL) presente en plasma, en dos o más ocasiones en las últimas 12 semanas, detectado de acuerdo a las guías de la International <i>Society on Thrombosis and Haemostasis</i>.</p> <p>2. Anticuerpos anticardiolipina (aCL) isotipo IgG o IgM en suero o plasma, presente en títulos altos o medios (&gt; 40 GPL o MPL o &gt; percentil 99), en dos o más ocasiones, en al menos 12 semanas medidas por un ELISA estandarizado</p> <p>3. Anticuerpos anti-<math>\beta_2</math>-Glicoproteína I (<math>\alpha\beta_2</math>-GPI) isotipo IgG o IgM en suero o plasma (en títulos &gt; percentil 99), en al menos 12 semanas excepto, medidas por ELISA estandarizado, de acuerdo a los procedimientos recomendados.</p> |

## **Anticuerpos antifosfolípidos**

Los aFL son un grupo heterogéneo de anticuerpos circulantes que reconocen diferentes factores proteicos y son los responsables de las manifestaciones clínicas del SAF.<sup>13,16,21</sup> Los principales anticuerpos asociados con el síndrome son: los aCL, el AL y los a $\beta_2$ -GPI, siendo los isotipos G, M y A los más frecuentes en los pacientes.<sup>9, 13, 22, 23</sup> Actualmente, también se ha descrito la participación de los anticuerpos anti-DI de isotipo IgG en los eventos trombóticos.<sup>10, 33, 42</sup>

## **$\beta_2$ -Glicoproteína-I**

La  $\beta_2$ -GPI, es el principal antígeno asociado al SAF, el cual se sintetiza principalmente en el hígado, aunque se ha encontrado el ARNm en células endoteliales, células placentarias, neuronas y astrocitos.<sup>24</sup> Su gen se localiza en el cromosoma 17q23-qter, presentando cuatro polimorfismos principales (S88N, L247V, C306G y W316S).<sup>25</sup> Consta de una cadena polipeptídica de 326 residuos de aminoácidos y su peso molecular es de aproximadamente 54 kDa, donde el 20% lo componen los carbohidratos.<sup>1, 26-28</sup> Contiene cinco dominios, los cuatro primeros (I-IV) constituidos por dominios repetidos altamente conservados de alrededor de 60 residuos de aminoácidos unidos por puentes disulfuro denominados “Dominios *Sushi*”, mientras que el dominio V es de tipo dominio *Kringler* (figura 1), siendo esta característica la que le permite ser agrupada en la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento (PRC) aunque sus funciones no cumplen con las proteínas de este grupo, Por otro lado, el último dominio (DV) consta de una región rica en lisina (18%), la cual le otorga un carácter positivo para así unirse a FL<sup>26,27,29</sup>, aunque la fuerza de unión es relativamente baja comparada con otros factores de

coagulación y otras proteínas plasmáticas.<sup>24</sup> Posee cuatro sitios N-glicosilados, tres de ellas localizadas en el dominio III y el restante en el dominio IV, las cuales le otorgan flexibilidad.<sup>26,27,29</sup> La  $\beta_2$ -GPI, se encuentra de manera natural en el plasma a una concentración entre 150-300  $\mu\text{g/mL}$ , en su conformación cerrada "O", donde el DI interactúa con el DV.<sup>30,31</sup> Sin embargo, se puede encontrar en otras conformaciones (J y S), siendo la más antigénica la conformación J, que se forma cuando la  $\beta_2$ -GPI se une a FL o superficies aniónicas y expone un epítipo crítico presente en el DI, ocasionando la interacción con los  $\alpha\beta_2$ -GPI, siendo estos los generadores de las manifestaciones clínicas en pacientes con SAF (figura 2).<sup>1, 26,27,31-33</sup>

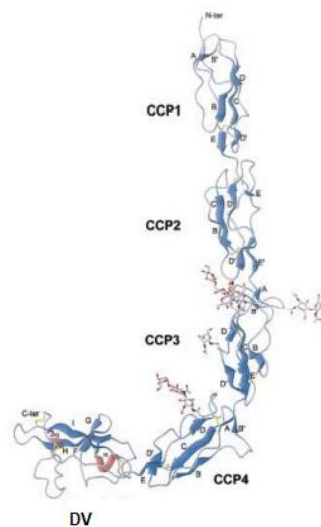


Figura 1. Estructura de la  $\beta_2$ -GPI. Marcada en azul con sus cuatro dominios repetidos altamente conservados (CCP1-4), los puentes disulfuro pueden observarse en amarillo y las hélices en rojo, los cuatro sitios N-glicosilados se pueden visualizar en los CCP 3 y 4.<sup>29</sup>



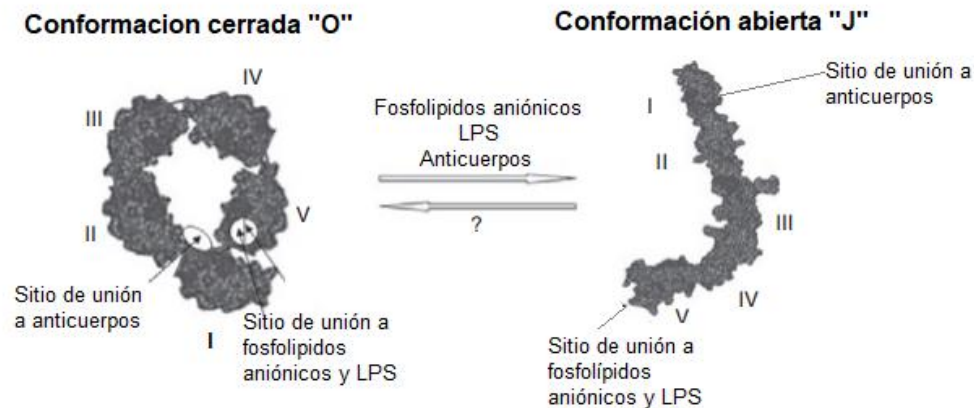


Figura 2. Conformación de la  $\beta_2$ -GPI. Equilibrio entre la conformación cerrada "O" y abierta "J", en la forma O hay una interacción entre el dominio I y V que evita la exposición del epítipo crítico G40-R43.<sup>27</sup>

Su principal función es su capacidad anticoagulante, pero, también tiene capacidad procoagulante en presencia de  $\alpha\beta_2$ -GPI patogénicos. Aunque también se ha visto involucrada en el metabolismo de los triglicéridos, en procesos de homeostasis como la remoción de cuerpos apoptóticos, la inhibición del Adenosin-DiFosfato (ADP) para la agregación plaquetaria y la regulación de la activación por contacto. Es capaz de formar múltiples complejos con el Receptor tipo Toll (TLR) 2, TLR 4, anexina A2, GPIb $\alpha$ , miembros de la familia de receptores de LDL y LRP8 (Receptor de proteínas de baja densidad relacionados a la proteína 8, conocida también como Receptor 2 de apolipoproteína E). Estas interacciones pueden explicar los mecanismos patológicos de los anticuerpos en pacientes con SAF. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la  $\beta_2$ -GPI lleva a cabo sus funciones aún no están firmemente establecidos.<sup>1, 27, 32, 34, 35</sup> En el 2011 se encontró una interacción entre la  $\beta_2$ -GPI y el lipopolisacárido (LPS) presente en las bacterias Gram negativas

provocando la estimulación de la respuesta inmune celular, encontrando un decremento de la proteína de un 25% en sujetos sanos lo que sugiere la unión de la misma al LPS.<sup>27, 36</sup>

### **Anticuerpos anticardiolipina**

Los aCL, reciben ese nombre porque, en un inicio se asociaba específicamente con la interacción a cardiolipina. Sin embargo, posteriormente se identificó que podían unirse a otros fosfolípidos aniónicos <sup>23</sup>, son principalmente inmunoglobulinas de isotipos G, M y A capaces de detectar a la cardiolipina en presencia de la  $\beta_2$ -GPI. Es uno de los marcadores serológicos usados más frecuentemente para el diagnóstico de SAF debido a que entre el 80 y 90% de los pacientes lo poseen y está asociado a las manifestaciones clínicas del síndrome; sin embargo, no es exclusivo del mismo ya que pueden observarse títulos elevados en otras enfermedades autoinmunes, infecciones o bien por la administración de algunos fármacos.<sup>16, 37</sup>

### **Anticuerpos anti $\beta_2$ -Glicoproteína I**

Los a $\beta_2$ -GPI son un grupo heterogéneo de anticuerpos de isotipo G y M principalmente, aunque también se ha observado la presencia de anticuerpos de isotipo A en pacientes con SAF.<sup>38</sup> El mecanismo exacto por el cual los anticuerpos reconocen a la  $\beta_2$ -GPI aún se desconoce; sin embargo existen fuertes hipótesis (figura 3) que tratan de explicar el fenómeno: la teoría de dimerización, en la que se forma un complejo que consta de dos moléculas de  $\beta_2$ -GPI y un anticuerpo, esta interacción incrementa hasta 100 veces la afinidad de la proteína por superficies

aniónicas lo que le confiere mayor avidez para interactuar con otras proteínas e inhibir su función, la segunda hipótesis se basa en la presencia de anticuerpos capaces de reconocer un epítipo crítico expuesto después de que la  $\beta_2$ -GPI sufre un cambio conformacional ocasionado por su unión a fragmentos proteicos propios o ajenos, por ejemplo en la presencia de un evento infeccioso y una última teoría que sugiere que normalmente la  $\beta_2$ -GPI circula en estado reducido, aproximadamente un 80% y cuando la molécula pasa a estado oxidado incrementa la afinidad de los  $\alpha\beta_2$ -GPI siendo así este estado el responsable en la iniciación de la respuesta inmune (figura 4).<sup>11, 24, 27, 39</sup>

### **Anticuerpos anti-Dominio I**

Actualmente, se han descrito anticuerpos  $\alpha\beta_2$ -GPI contra diferentes epítipos, que abarcan desde el dominio I al V e incluso en regiones “inter-dominio”; sin embargo, se ha demostrado en distintas poblaciones que el principal epítipo, cuyos anticuerpos aparecen hasta en un 58% de pacientes con SAF, se encuentra en el Dominio I en la posición G40-R43, aunque muchos investigadores afirman que este epítipo reactivo se encuentra posicionado en el interdomino I-II (A39-A43), la presencia de estos anticuerpos de isotipo IgG se han visto fuertemente relacionados con el riesgo de trombosis, principalmente venosa, y complicaciones obstétricas en pacientes con SAF, aunque en general este isotipo es el de mayor correlación con estos eventos.<sup>10,22,39-41</sup> Los anticuerpos anti-DI de la  $\beta_2$ -GPI tienen una alta relación con él AL y en conjunto son un fuerte factor de riesgo a trombosis.<sup>17, 24, 41</sup>

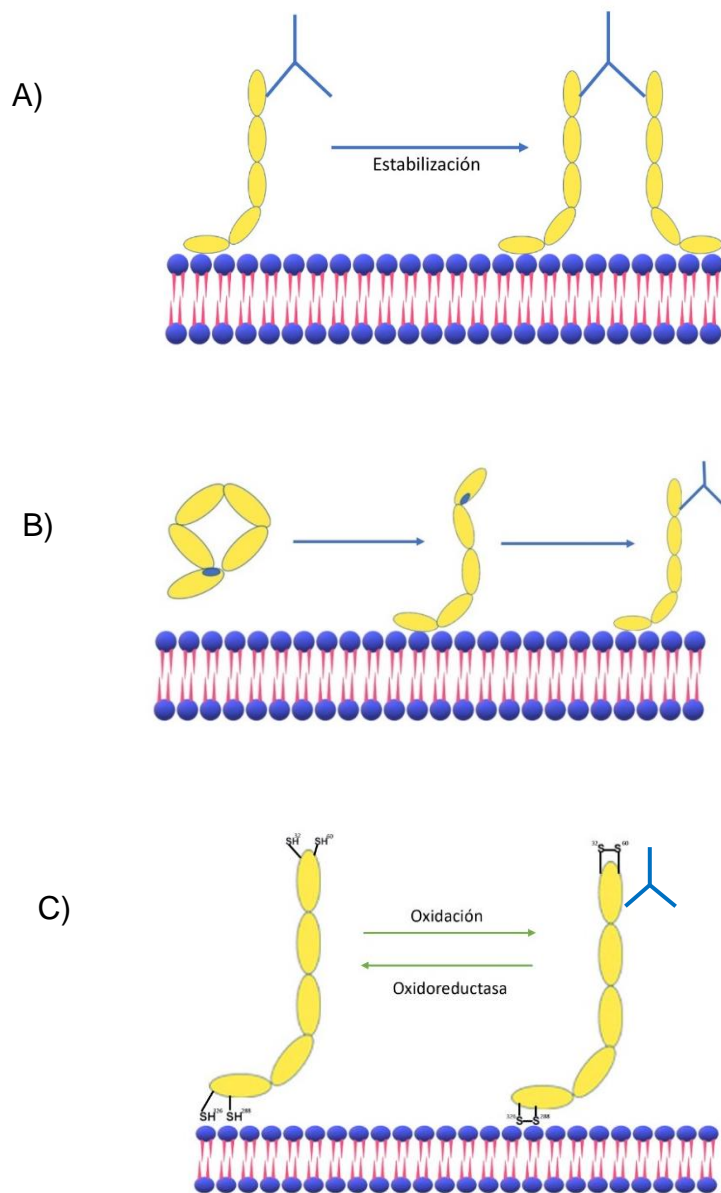


Figura 3. Mecanismo de la  $\beta_2$ -GPI. A) Teoría de la dimerización: El anticuerpo se estabiliza e incrementa su afinidad al hacer contacto con dos proteínas de la  $\beta_2$ -GPI. B) Teoría del cambio conformacional: El anticuerpo se une hasta que ocurre un cambio conformacional, a su forma “S” y/o “J”, que expone al epítipo crítico localizado en el dominio I. C) Teoría de la  $\beta_2$ -GPI oxidada: La  $\beta_2$ -GPI se vuelve patogénica hasta que sus grupos tioles localizados en C32- C60 y C288-C326 se oxidan.

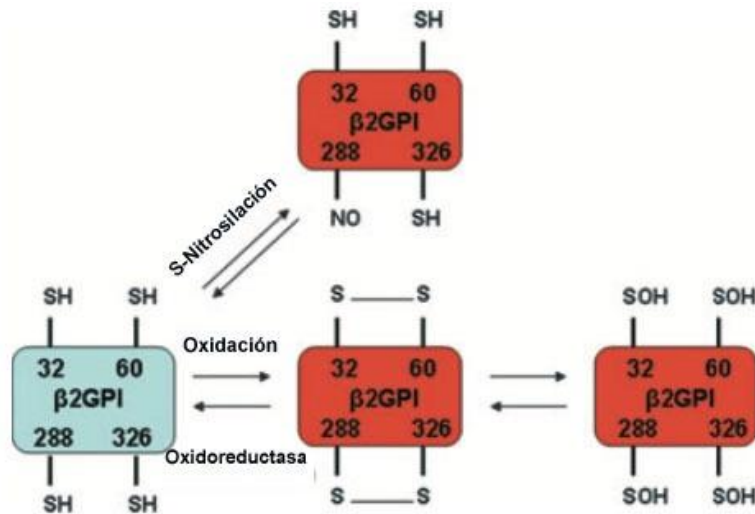


Figura 4. Equilibrio entre la forma reducida y oxidada de la  $\beta_2$ -GPI. Su estado reducido (azul) *in vivo* circula normalmente con tioles libres en las posiciones C288-C326 y C32-C60; sin embargo, al oxidarse acontece un cambio en donde ocurre la formación RSSR, RSOH y RSNO.<sup>11</sup>

Se ha observado en modelos animales que cuando los  $\alpha\beta_2$ -GPI, principalmente anti-DI, se unen a la  $\beta_2$ -GPI en las superficies celulares, el resultado es la activación de células endoteliales, plaquetas, monocitos, neutrófilos, fibroblastos y trofoblasto, los receptores con los que la  $\beta_2$ -GPI interactúa de manera natural inducen al fenotipo protrombótico y a la producción de citocinas proinflamatorias (figura 5). Además, estos anticuerpos están asociados con el incremento del factor tisular, responsable del inicio de la cascada de coagulación. En general también se ha señalado que los aFL son capaces de activar los factores C3, C5 y C6, y además de manera *in vitro* inducen resistencia a la proteína C-reactiva que limita el acceso de esta hacia su sustrato (figura 6).<sup>20</sup>

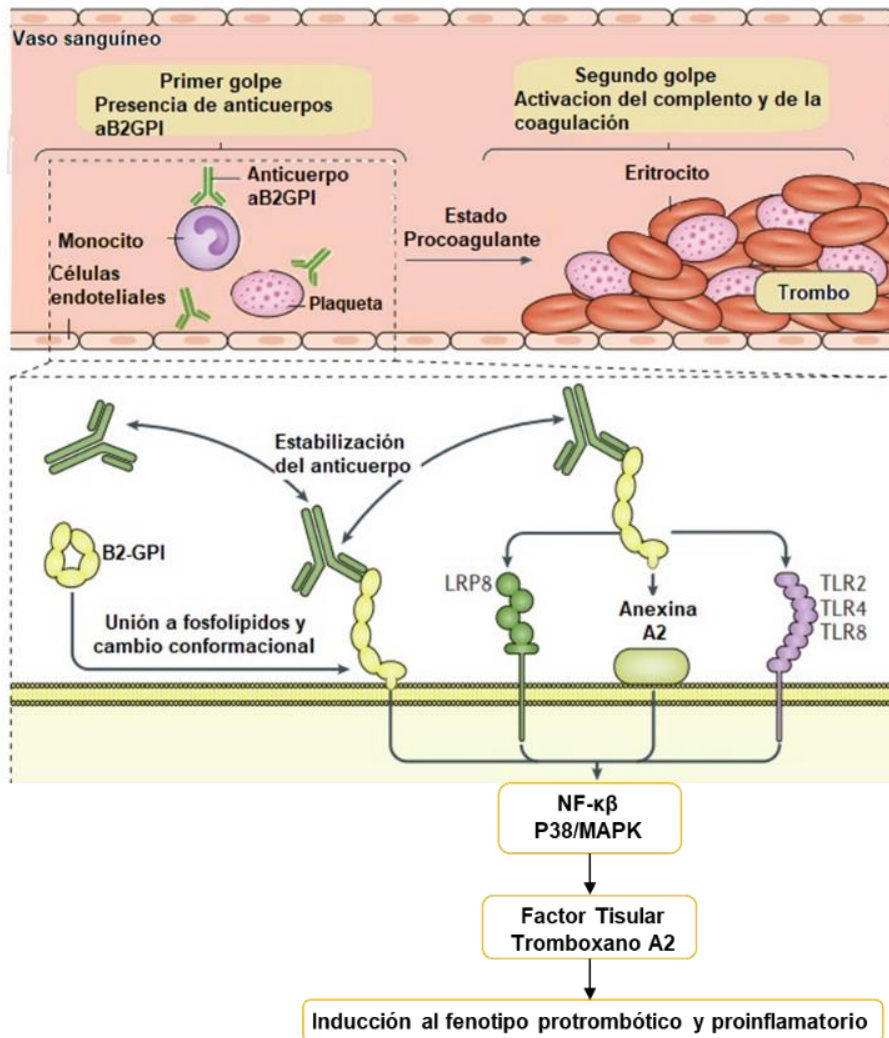


Figura 5. Patofisiología de la  $\beta_2$ -GPI asociada a trombosis. La formación de trombos se asocia a la presencia de  $\alpha\beta_2$ -GPI involucrados en un modelo “multigolpe” donde la respuesta es mucho más fuerte. En el primer golpe, las células inmunes, plaquetas y células endoteliales se ven afectadas por los  $\alpha\beta_2$ -GPI, lo que se traduce en la activación de mecanismos aún desconocidos. En el segundo golpe, el complemento acelera fuertemente la formación del trombo.<sup>20</sup> LRP8: Receptor de proteínas de baja densidad relacionados a la proteína 8; MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos; NF –  $\kappa$ B: Factor nuclear-  $\kappa$ B; TLR: Receptor tipo Toll.

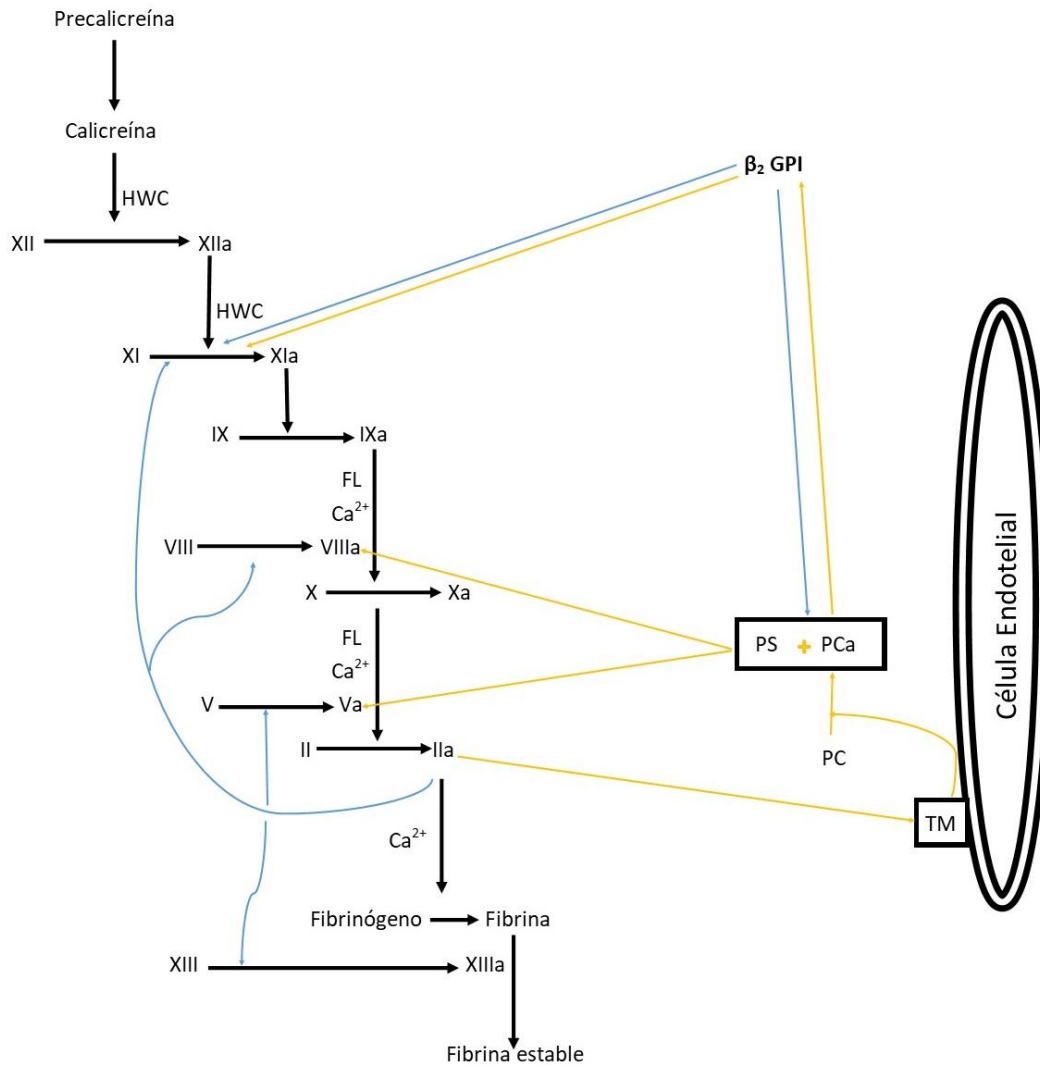


Figura 6. Efectos de la  $\beta_2$ -GPI en la Cascada de coagulación. Las líneas en color azul representan las acciones pro-coagulantes mientras que las líneas en amarillo muestran la promoción de la fibrinólisis.

Los métodos de detección de los  $\alpha\beta_2$ -GPI son mediante ELISA dependiente o independiente de CL con técnicas estandarizadas previamente y apegados a los valores establecido en los Criterios de Sídney. Actualmente no existen ensayos de ELISA comercial para la detección de anticuerpos anti-DI, generalmente cada laboratorio establece un método de detección (con fines académicos); no obstante

hay un inmunoensayo de quimioluminiscencia basado en el sistema *BIO-FLASH* (*Biokit*, Barcelona, España) que utiliza el DI recombinante de la  $\beta_2$ -GPI acoplado a partículas paramagnéticas.<sup>10</sup> En un estudio donde se evaluaron 5 métodos diferentes, este inmunoensayo obtuvo un coeficiente de variación (CV) <10% al igual que un ensayo por ELISA directo basado en un sistema de expresión bacteriano en placas queladas con níquel mientras que ELISA comerciales obtenían una discrepancia frente a estos de 5% o más, aunado a esto se demostró que todos los ensayos seguían teniendo problemas semejantes a aquellos donde se utilizaba la  $\beta_2$ -GPI integra.<sup>42</sup>

Se ha discutido rigurosamente la adición de los anticuerpos anti-DI como criterio para el diagnóstico de SAF ya que en conjunto con otros aFL pueden predecir de manera más certera el riesgo de trombosis y/o complicaciones obstétricas y así mismo podrían ofrecer el enfoque a tratamientos en pacientes con SAF<sup>22,33</sup>, sin embargo, es necesario la estandarización de técnicas para detectar estos anticuerpos, así como un valor de los mismos para que puedan brindar utilidad clínica.

### **Anticoagulante lúpico**

El AL se define como un grupo de anticuerpos de isotipo G, M y A capaces de inhibir a la coagulación en las pruebas dependientes de fosfolípidos: tiempo del Veneno de víbora diluido de Russel (dRVVT, por sus siglas en inglés), tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPa) y Tromboplastina Parcial Activada con Kaolín (KPTT, por sus siglas en inglés), su identificación debe llevarse a cabo por



al menos dos de estas pruebas. Aunque en pacientes no siempre puede identificarse debido a el tratamiento con medicamentos anticoagulantes o a la alteración de otros factores proteicos involucrados en la cascada de coagulación como el Factor VIII o la proteína C-reactiva que pueden dar resultado falso-negativos o falso-positivos. *In vivo* posee una actividad procoagulante, la cual ha sido fuertemente asociada a eventos trombóticos y pérdidas fetales.<sup>1,32</sup> Estos anticuerpos generalmente están presentes en enfermedades autoinmunes como LEG y SAF; sin embargo, también han sido identificados en la población normal.<sup>23</sup>

### **Otros anticuerpos asociados a SAF**

Actualmente se han descrito otros anticuerpos que pueden ayudar junto con los anteriores al pronóstico y diagnóstico del SAF, un ejemplo de estos son los antifosfatidilserina/protrombina (aPS/PT). Siendo un grupo de anticuerpos de isotipo G y M que actúan contra el complejo fosfatidilserina-protrombina y que en los últimos años han reportado una alta asociación con trombosis arteriales y principalmente venosas, ya que existe un riesgo elevado (entre 3 a 18 veces) de presentar trombosis. Además, tiene una alta correlación con AL, por lo que se ha sugerido la inclusión de estos anticuerpos en el criterio de SAF, ya que pueden ser una alternativa del AL en pacientes con tratamientos anticoagulantes.<sup>43</sup> Por otro lado, existen también anticuerpos contra Anexinas, proteína C-reactiva, FXI, FXII, que están presentes en pacientes con SAF, pero que aún se desconoce su relevancia clínica.<sup>13, 22, 41</sup>

## **Planteamiento del problema**

Los anticuerpos contra los diferentes epítomos encontrados en los Dominios (I-V) de la  $\beta_2$ -Glicoproteína I están relacionados con el síndrome de antifosfolípidos y sus manifestaciones clínicas, principalmente contra el Dominio I; es por ello que se pretende desarrollar y estandarizar un ELISA de DI, para determinar la reactividad de los anticuerpos anti-DI de la  $\beta_2$ -Glicoproteína I en la población mexicana y su posible relevancia clínica.

## **Pregunta de Investigación**

¿El ELISA casero anti-DI desarrollado, tendrá utilidad clínica en pacientes con SAF de población mexicana?

## **Hipótesis**

La estandarización de un ELISA casero para anti-DI, permitirá detectar anti-DI relacionados con eventos trombóticos en pacientes mexicanos con SAF.

## **Objetivos**

- Expresar y purificar el DI de la  $\beta_2$ -Glicoproteína I clonada en cepas HB-DI
- Estandarizar el método de detección por ELISA para los anticuerpos contra el DI- $\beta_2$ GPI
- Validar el ELISA casero para la detección de los anti-DI- $\beta_2$ GPI

## **Material y métodos**

### **Diseño de estudio**

Estudio experimental.

### **Universo**

#### **Sujetos sanos**

Se incluyeron sujetos sanos donadores del banco de sangre del INCMNSZ, y que no tuvieran alguna manifestación clínica de enfermedad autoinmune o de otra índole, se eliminaron aquellos sujetos que no llenaran bien los datos de valoración o bien que dieran positivo a la detección de anticuerpos de alguna enfermedad infecciosa y no sean candidatos a donar sangre.

#### **Pacientes**

Se incluyeron pacientes con SAF que cumplieran los criterios de Sídney<sup>9</sup> y que no presentara una o más enfermedades autoinmunes diferentes a SAF, se eliminaron a los pacientes que no aceptarán el consentimiento informaron o que no tuvieran el historial clínico completo.

#### **Variables**

Independientes: Dominio I de la  $\beta_2$ -Glicoproteína I recombinante

Dependientes: Anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI

## Técnicas

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Electroforesis
- Expresión de proteína mediante IPTG en bacterias HB-DI
- Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)
- Tinción de plata
- *Western Blot*
- Electroelución pasiva
- Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconínico
- Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

## Procedimiento

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se tomaron cepas *E. coli* HB2151 transformadas con el vector pCANTAB 5 que contiene el inserto del DI (residuos de aminoácidos del 1-70) (HB-DI). Posteriormente mediante el kit de PCR Invitrogen (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) y de acuerdo a las especificaciones del fabricante se realizó una amplificación con las siguientes condiciones 95°C 2 min un ciclo; 95°C 20 seg, 54°C 30 seg, 72°C 30 seg, 35 ciclos; y 72°C 5 min un ciclo, utilizando los oligonucleótidos (Forward DIF-1 5'-AAT CGG AAT TCA TTT CTC CAG TGC TCA TCT TGT TCT-3' y Reverse DIR-1 5'-CAT CAT GCG GCC GCC CAG CAA AAG GAC ATA CTC T-3') y el termociclador *Corbett modelo RG-6000* (Sydney, Australia) utilizando el programa Roto-gene 6000 versión 1.7 para verificar la existencia del inserto. La banda se visualizó en un gel de agarosa al 1.0%

### **Expresión de proteína en bacterias HB-DI**

Las cepas HB-DI se sembraron en una placa con medio SOBAG-N a 30° C toda la noche. Se transfirió una colonia del medio a un tubo con 5 mL de medio 2xYTAG y se incubó toda la noche a 30° C, al día siguiente se añadió el cultivo a un tubo cónico con 30 mL de medio 2xYTAG y se incubó por 1 hora a 30°C. El cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos y se removió el sobrenadante. Las HB-DI se resuspendieron con 50 mL de medio 2xYTAG y se incubaron por 3 horas a 30°C para después centrifugarse por 20 minutos a 3500 rpm. Se removió el sobrenadante y se resuspendieron con 1 mL de PBS, para después realizar 2 lavados. Las HB-DI se resuspendieron con 500µL de 1xTES frío y posteriormente se añadió 750 µL de 1/5 TES frío lentamente. El tubo se mezcló en el vortex por un minuto y posteriormente se incubó en hielo por 30 minutos. El microtubo se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm y se obtuvo el sobrenadante (periplasma) en un microtubo nuevo, finalmente se guardó a -20 °C hasta su uso. El periplasma se corrió en un gel de poliacrilamida (PAGE) al 12 %.

## **Tinción de plata**

El PAGE se lavó durante 5 minutos con agua destilada y se incubó a temperatura ambiente por una hora en una solución de ácido tricloroacético (5g/25 mL). Posteriormente, se dejó reposar durante una noche en una mezcla de etanol/ácido acético (proporción 4:1:5 etanol/ácido acético/agua destilada). Al día siguiente, se incubó el gel en una nueva solución de etanol/acético durante 30 min en agitación y se lavó 2 veces con agua destilada por 20 minutos, se añadió glutaraldehído al 10 % por 30 minutos en agitación, se realizaron 3 lavados con agua destilada por 20 minutos cada uno. Se adicionó 25 mL de una solución de plata (5.26 mL de NaOH al 36%, 0.1 g de AgNO<sub>3</sub> y <500 µL de NH<sub>4</sub>OH) durante 15 minutos. Se lavó el gel 3 veces durante 5 minutos con agua destilada, y se le adiciono 25 mL de la solución reveladora (125 mL de ácido cítrico y 13 µL de Formaldehido), la tinción se detuvo cuando se visualizaron correctamente las bandas mediante una mezcla de etanol/acético y se hidrato con agua destilada durante 5 minutos.

## **Identificación del DI**

### **Electroinmunotransferencia**

La transferencia se realizó en una cámara semihúmeda a 20 V durante 25 minutos (*Transblot-SD Semi-dry transfer cell*, Biorad, EUA), posteriormente la membrana se bloqueó con leche al 3% en PBS-tween al 0.05 % (LPBST) durante una hora a 37 °C, y se añadió suero diluido 1:100 de paciente positivo a β<sub>2</sub>GPI en LPBST durante 2 horas a 37°C, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-tween 0.05% (PBST). Se adicionó anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:5000) en solución de LPBST y se incubó a 37 °C por 1 hora, la membrana

se lavó por 10 minutos en PBST en 3 ocasiones. Se revelaron las bandas mediante una solución del sustrato *Fast-Red* en Buffer de fosfatos.

## **Purificación del DI**

### **Electroelución pasiva**

Se purificó la proteína mediante electroelución pasiva, una vez realizado el PAGE al 12% se cortó la banda donde de DI y se transfirió a un tubo nuevo con buffer de electroforesis, se dejó reposar a 4°C durante 48 horas. Se recolectó el buffer y se fragmentó el gel con la ayuda de un fragmentador de geles *Ultrafree-DA (Millipore Corporation, Massachusetts, EUA)* el sobrenadante obtenido se sometió a diálisis por 36 horas y se realizó un PAGE para verificar que en la solución se encontraba la proteína de interés, se cuantificó la proteína mediante el método de ácido bicinconínico de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

### **Estandarización del ELISA**

Se sensibilizó una placa de 96 pozos de alta-unión (Costar) con la proteína purificada a diferentes concentraciones, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 µg del DI en buffer de carbonatos cpb 50 µL por pozo y se incubó toda la noche. La placa se bloqueó con Albúmina al 1.5% en PBS (APBS), durante 1 hora y se añadió el suero de un paciente diagnosticado con SAFP y con títulos elevados de anticuerpos aβ<sub>2</sub>GPI, a diferentes diluciones, 1:50, 1:100 y 1:200 en APBS, durante 1 hora a 37°C, se realizó 3 lavados con PBST y se adicionó un anticuerpo antihumano conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000 en APBS y se incubó por 1

hora a 37°C, la placa se lavó 3 veces con PBST y se adicionó p-nitrofenil fosfato en amortiguador de dietanolamina como sustrato durante 1 hora a 37°C, las lecturas se obtuvieron a 405 nm en un lector de ELISA (*TECAN, Sunrise*). La curva 4PL se realizó con el programa *Four Parameter Logistic Curve (MyAssays)*.

### **Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Se sensibilizó una placa de 96 pozos con la proteína purificada durante toda una noche a 4°C a una concentración de 0.01 µg/pozo en Buffer de carbonatos, al día siguiente se realizó 3 lavados con 300 µL de PBST y se bloqueó con APBST durante 1 hora a 37°C, seguido de esto la placa se lavó 3 veces con PBST. Se añadió los sueros (Dilución 1:100 en APBS) y se incubó 1 hora a 37°C, se lavó la placa 3 veces con 300 µL de PBST. Posteriormente, se añadió 100 µL del conjugado (IgG Humana-Fosfatasa Alcalina, dilución 1:2500 en PBST) y se incubó por una hora a 37 °C. Se realizaron 3 lavados con 300 µL de PBST. Como siguiente paso se añadió a cada pozo 100 µL de sustrato (1 tableta de p-nitrofenil fosfato en 5 mL de amortiguador de dietanolamina), 30 minutos después la placa se leyó en un espectrofotómetro a 405 nm.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron mediante U de Mann-Whitney, Chi-cuadrada, Curvas ROC, según fuera conveniente, en el programa SPSS (*IBM SPSS Statistics 20*) y *GraphPad Prism (GraphPad Prism 8.0.1)*.



## Resultados

### Sujetos sanos

Se obtuvieron 38 sujetos sanos, el 53% mujeres, con edad promedio de  $34.5 \pm 11.5$  años y no presentaron manifestaciones clínicas de alguna enfermedad al momento de la toma de muestra, también fueron negativos para los distintos anticuerpos evaluados. Para los pacientes, el 75% fueron mujeres, con una edad promedio de  $45.3 \pm 15$  años, con  $9.5 \pm 6.5$  años de tiempo de evolución de la enfermedad, presentaron anticuerpos aCL positivos (79% IgG y 87% IgM),  $a\beta_2$ GPI positivos (81% IgG y 80% IgM), AL positivo (70%) y aPS/PT IgG positivo (61%) (Tabla 2).

Tabla 2. Características generales de sujetos sanos y pacientes

|  | Sujetos sanos (n=38) | Pacientes con SAF (n=40) |
|--|----------------------|--------------------------|
| Sexo femenino, n(%)                            | 22 (53)              | 29 (75)                  |
| Edad, años prom. $\pm$ DE                      | $34.5 \pm 11.5$      | $45.3 \pm 15$            |
| Evolución de la enfermedad, años prom $\pm$ DE | 0                    | $9.5 \pm 6.5$            |
| aCL IgG, n(%)                                  | 0 (0)                | 32 (79)                  |
| aCL IgM, n(%)                                  | 0 (0)                | 35 (87)                  |
| $a\beta_2$ GPI IgG, n(%)                       | 0 (0)                | 33 (81)                  |
| $a\beta_2$ GPI IgM, n(%)                       | 0 (0)                | 32 (80)                  |
| AL, n(%)                                       | 0 (0)                | 28 (70)                  |
| aPS/PT IgG, n(%)                               | 0 (0)                | 25 (61)                  |

### Estandarización de ELISA para anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI

Se verificó la presencia del inserto de DI en las colonias HB-DI mediante PCR, obteniendo un fragmento de aproximadamente 278pb (Figura 7), que es aproximado con el tamaño deseado de 260 pb, de acuerdo a lo reportado en la base de datos *GenBank* (datos no mostrados). Posteriormente las bacterias HB-DI se estimularon con IPTG para la expresión de DI, observando incremento en una banda de aproximadamente 19 kDa en 3 de 4 clonas probadas (Figura 8).

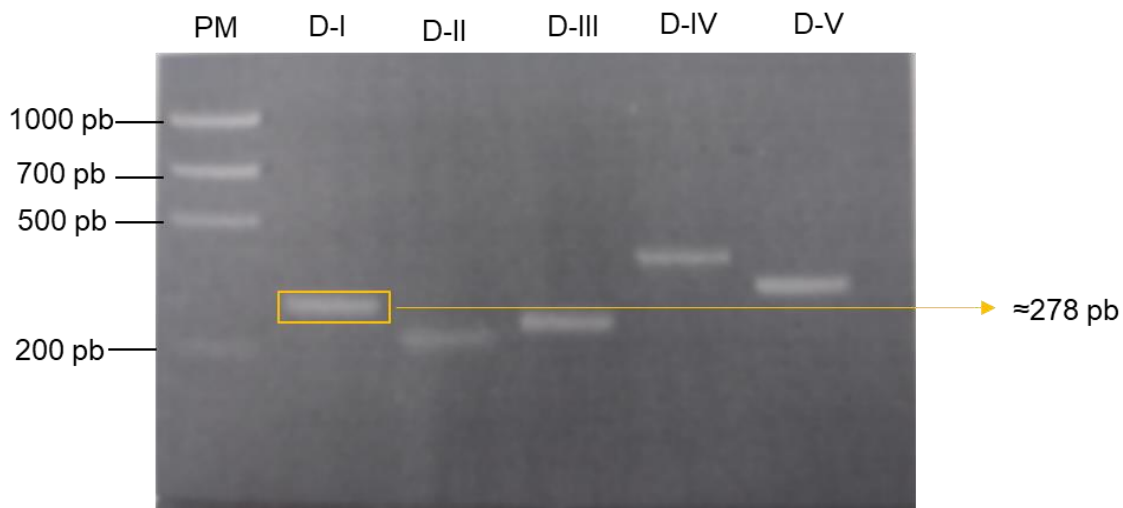


Figura 7. Verificación del inserto en bacterias HB-DI en un gel de agarosa al 1.5%, la visualización de la banda se realizó con BrEt.

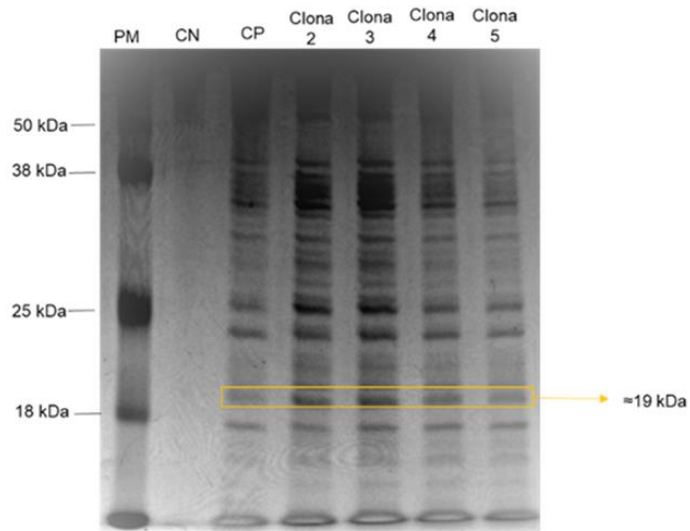


Figura 8. Expresión del DI en bacterias HB-DI en PAGE al 12%; PM= peso molecular; CN= control negativo; CP= control positivo.

La banda identificada como DI se purificó mediante electroelución pasiva obteniendo una concentración de 0.067  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 9A) y se identificó el DI mediante *western blot* (figura 9B).

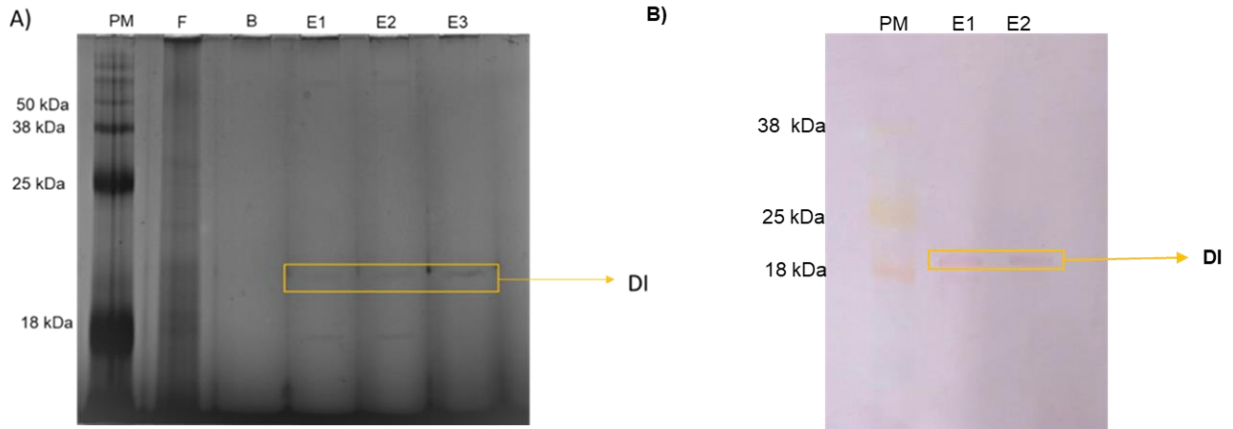


Figura 9. A) Purificación del DI, verificación por medio de una tinción de plata en gel de poliacrilamida (PAGE) al 12%; PM= peso molecular; F= fluido; B= amortiguador de elución; E1= eluido 1; E2= eluido 2; y E3= eluido 3. B) Verificación de la proteína DI de la  $\beta_2$ -GPI con anticuerpos  $\alpha\beta_2$ -GPI mediante Western Blot; PM= peso molecular, E1= eluido 1 y E2= eluido 2.

### La estandarización de la curva 4PL

Una vez encontrando la concentración óptima de DI (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ), se realizó la estandarización de curva 4PL con diferentes diluciones de un suero con títulos elevados de anticuerpos  $\alpha\beta_2$ -GPI, la curva resultante presentó una  $R^2$  de 0.9977 (figura 10) obteniendo en la concentración más baja (10 UA) una absorbancia de 0.1 y en la más alta (300 UA) una absorbancia de 1.55.<sup>45,46</sup>

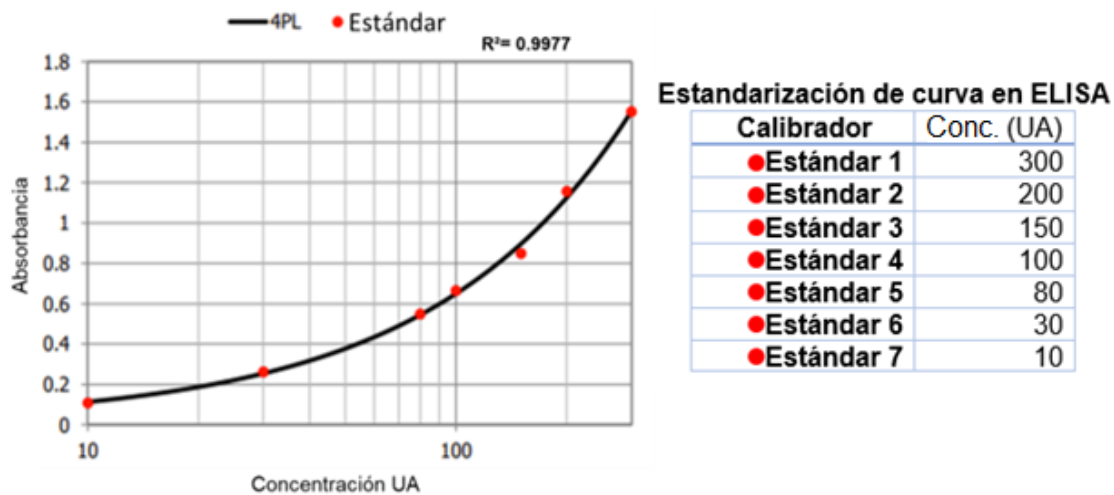


Figura 10. Curva 4PL Estandarización de Curva Estándar en ELISA. ( $R^2= 0.9977$ )

Después de estandarizar el ELISA, se realizó la detección de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI en 38 sueros de sujetos sanos y 40 sueros de pacientes diagnosticados con SAFP. Los sujetos sanos mostraron menor presencia de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI comparada a los pacientes con SAFP (sujetos sanos,  $M_e=13.15$  RI [11.05-18.25] vs pacientes con SAFP,  $M_e=31.95$  RI [21.28-41.80];  $p < 0.0001$ ) (Figura 11)<sup>9</sup>.

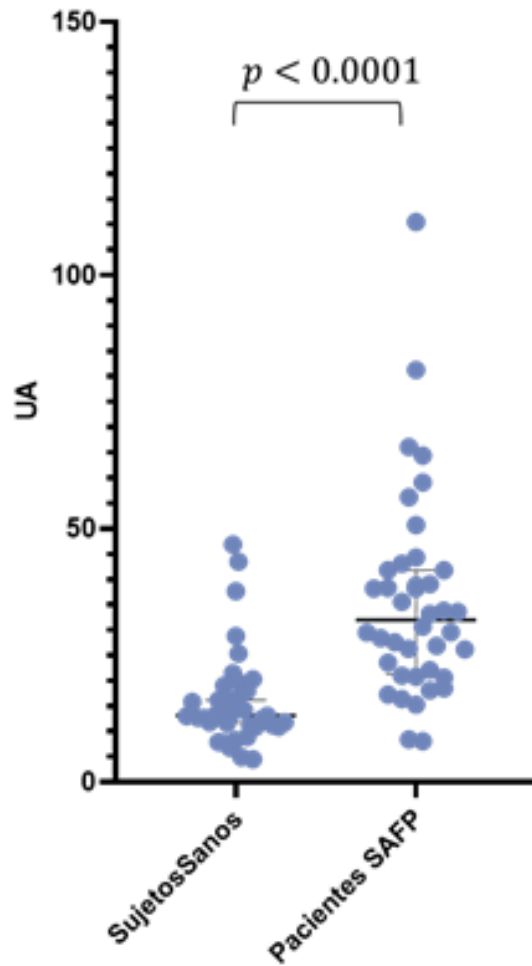


Figura 11. Anticuerpos anti-DI de la  $\beta_2$ -GPI. Anticuerpos contra el Dominio I en sujetos sanos y en Pacientes con SAFP, medidos en unidades arbitrarias (UA)

Posteriormente se realizó una Curva ROC para establecer el punto de corte (valor de referencia) y diferenciar entre resultados positivos y negativos para la prueba de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI (figura 12). Se estableció el punto de corte para en  $> 20.45$  UA con una sensibilidad de 82.5% y especificidad de 84.21%.

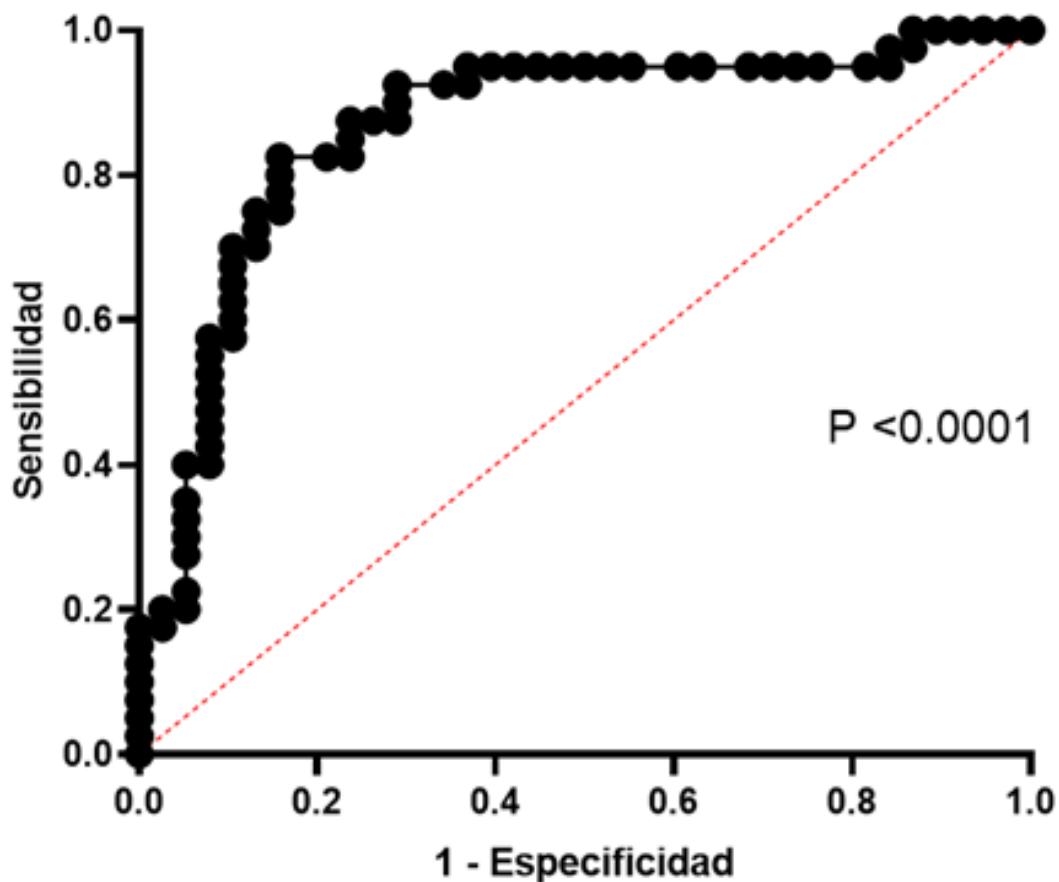


Figura 12. Curva ROC para Anticuerpos anti-DI de la  $\beta_2$ -GPI. Área bajo la curva de 0.8651. ( $p < 0.0001$ ).

Para asegurar la efectividad del método, se compararon los resultados obtenidos del ELISA de los pacientes con SAFP y los obtenidos por la técnica de quimioluminiscencia (*Bioflash*), encontrando que no existe correlación entre estos métodos ( $R = -0.008705$ ) (figura 13).

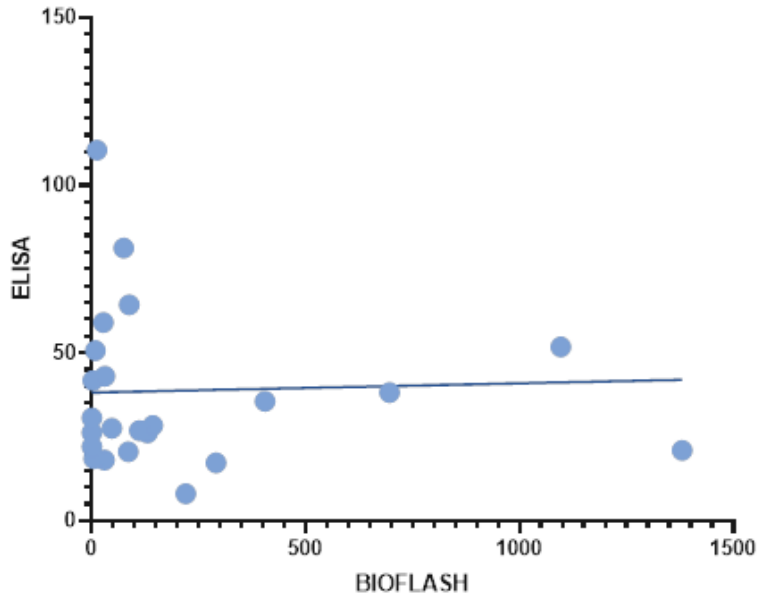


Figura 13. Comparación de resultados de anticuerpos aDI de la  $\beta_2$ GPI. Comparación entre los resultados obtenidos para anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI en 24 pacientes con SAFP utilizando correlación de Spearman ( $R=-0.008705$ ).

Se revisó el historial clínico de 26 pacientes con SAFP para buscar la relación entre la presencia de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI y eventos trombóticos, se encontró que 15 pacientes (75%) con anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI positivos presentaron trombosis, y solo 5 (25%) no presentaron trombosis, por su parte en los 6 pacientes negativos contra aDI- $\beta_2$ GPI solo 3 (50%) presentaron trombosis (figura 14), pero no hubo una diferencia significativa. Por otro lado, cuando se analizó por el tipo de trombosis, se encontró que 13 pacientes (81%) con aDI- $\beta_2$ GPI positivo presentaron trombosis venosa y 3 trombosis arterial (19%), por su parte los pacientes con aDI- $\beta_2$ GPI negativo todos (100%) presentaron una trombosis venosa (figura 15).



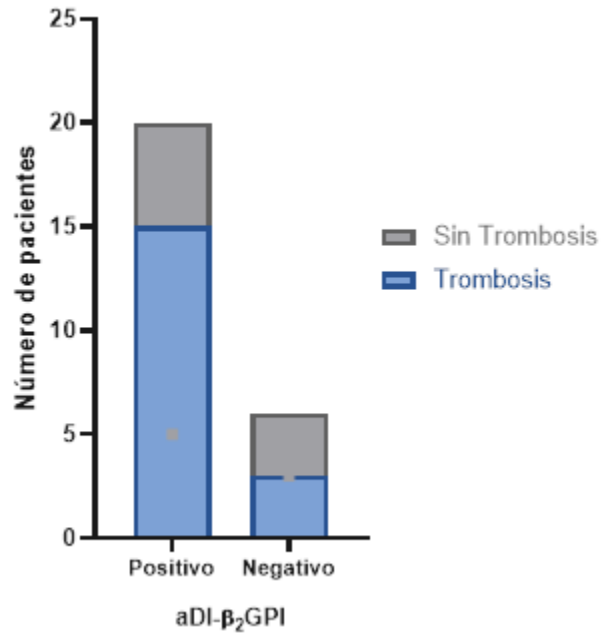


Figura 14. Relación entre los eventos trombóticos en 26 pacientes con SAFP y la presencia de aDI-β<sub>2</sub>GPI detectados mediante ELISA.

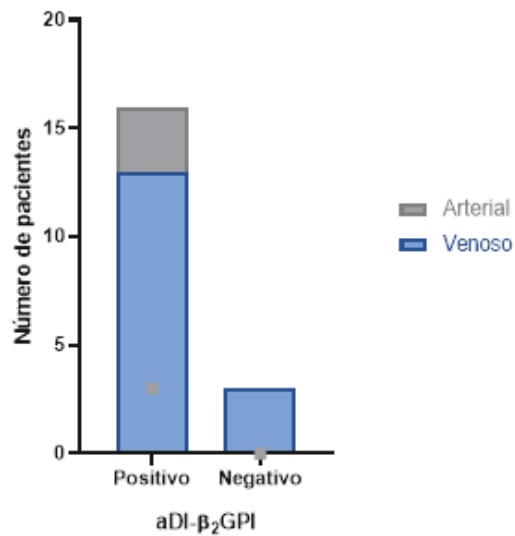


Figura 15. Relación entre el tipo de evento trombótico en 19 pacientes con SAFP y la presencia de aDI-β<sub>2</sub>GPI detectados mediante ELISA.

Al buscar la relación entre anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI con los anticuerpos a $\beta_2$ GPI IgG, 12 pacientes (60%) con anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI positivo presentaron anticuerpos a $\beta_2$ GPI IgG positivos, mientras que el restante (40%) fueron a $\beta_2$ GPI negativos. Por su parte, 5 pacientes (83%) con aDI- $\beta_2$ GPI negativo fue a $\beta_2$ GPI positivo (Figura 16). Mientras que, solo 4 pacientes (20%) positivos para aDI- $\beta_2$ GPI presentaron anticuerpos a $\beta_2$ GPI IgM positivo y 16 (80%) tuvieron a $\beta_2$ GPI IgM negativo (figura 17).

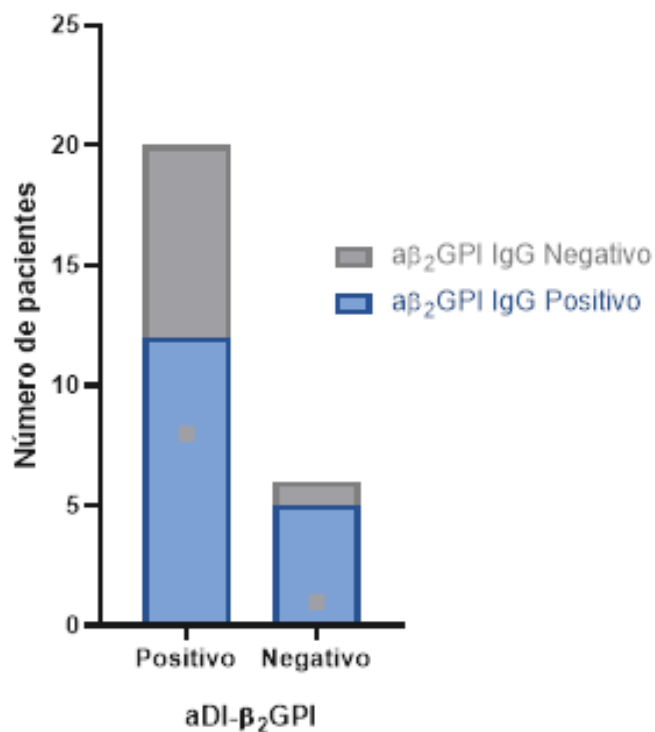


Figura 16. Relación entre los resultados de 26 pacientes para anticuerpos a $\beta_2$ -GPI isotipo IgG y aDI- $\beta_2$ GPI detectados mediante ELISA.

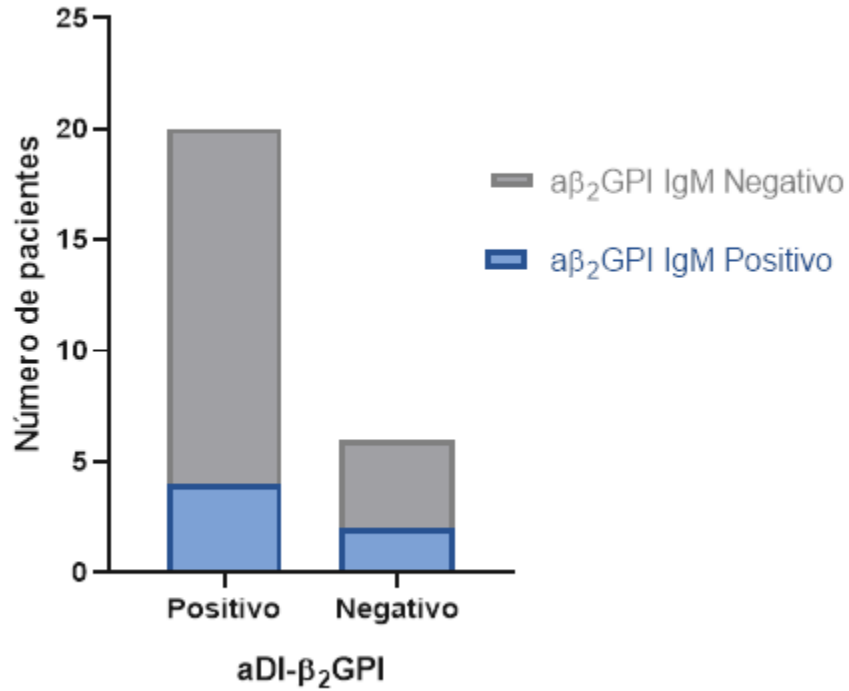


Figura 17. Relación entre los resultados de 26 pacientes para anticuerpos aβ₂-GPI isotipo IgM y aDI-β₂GPI detectados mediante ELISA.

Para el caso de los anticuerpos aCL, de los pacientes con aDI-β₂GPI positivo 11 (55%) fueron positivos para aCL IgG y 9 (45%) fueron negativos para aCL IgG, mientras que de los pacientes con aDI-β₂GPI el 50% (3) fueron positivos para aCL IgG (Figura 18). Por su parte, cuando vemos el caso de los aCL IgM observamos que el 70% (14) presentan aDI-β₂GPI positivo y aCL IgM negativo, solo 6 (30%) tiene ambos anticuerpos positivos (Figura 19).

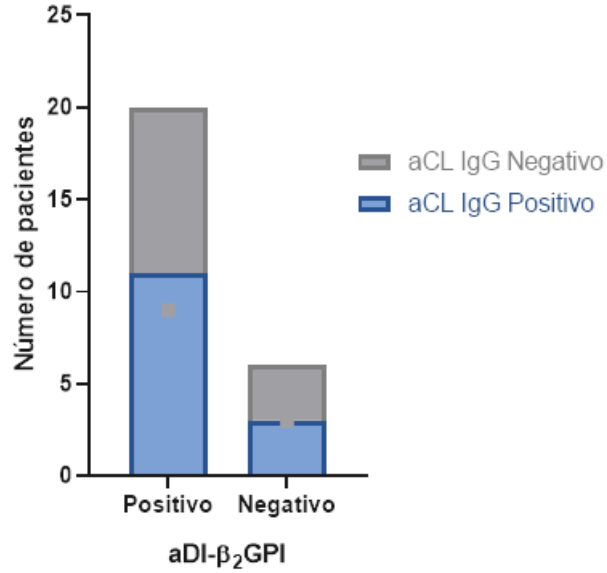


Figura 18. Relación entre los resultados de 26 pacientes para anticuerpos aCL isotipo IgG y aDI-β<sub>2</sub>GPI detectados mediante ELISA.

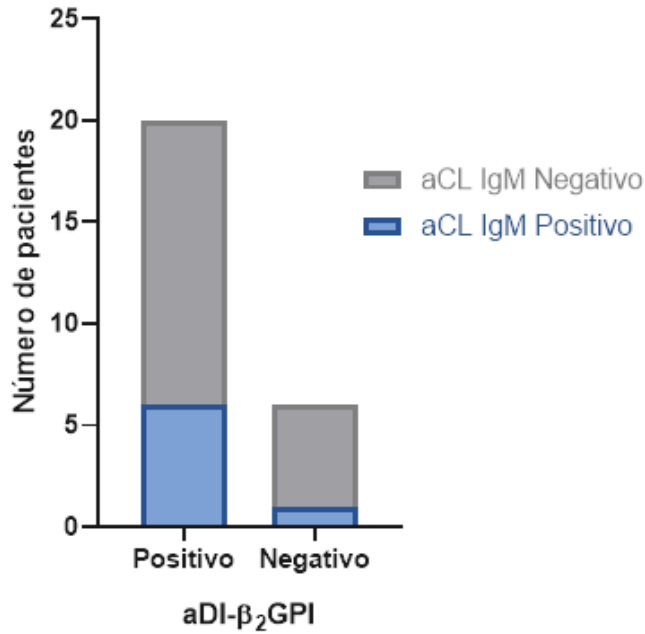


Figura 19. Relación entre los resultados de 26 pacientes para anticuerpos aCL isotipo IgM y aDI-β<sub>2</sub>GPI detectados mediante ELISA.

Al buscar la relación de los aDI- $\beta_2$ GPI con el AL, se encontró que 16 pacientes (84%) presentaron positividad para ambos marcadores y solo 3 (16%) tuvieron AL negativo. De los pacientes con aDI- $\beta_2$ GPI negativo solo 2 (40%) presentaron AL positivo (Figura 20).

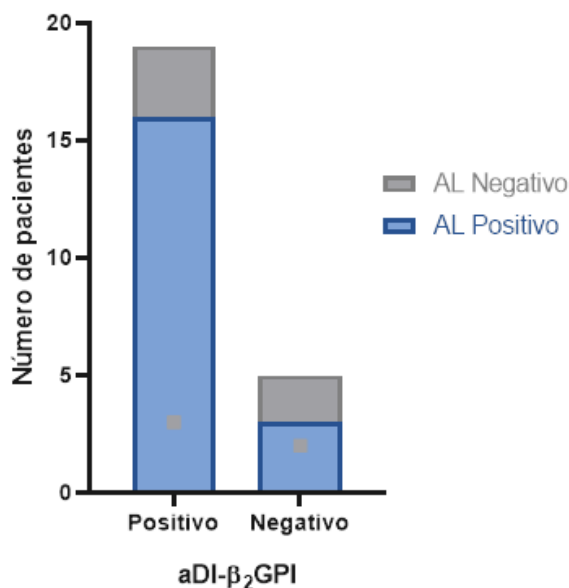


Figura 20. Relación entre los resultados de 24 pacientes para AL y aDI- $\beta_2$ GPI detectados mediante ELISA.

En el caso para los anticuerpos aPS/PT, 12 pacientes (60%) con aDI- $\beta_2$ GPI positivos presentaron anticuerpos aPS/PT IgG y solo 8 (40%) fueron aPS/PT negativo (Figura 21). Observándose un caso similar para aPS/PT IgM donde 13 pacientes (65%) con aDI- $\beta_2$ GPI positivo también fueron aPS/PT positivo y el restante (35%) fue aPS/PT negativo (Figura 22).

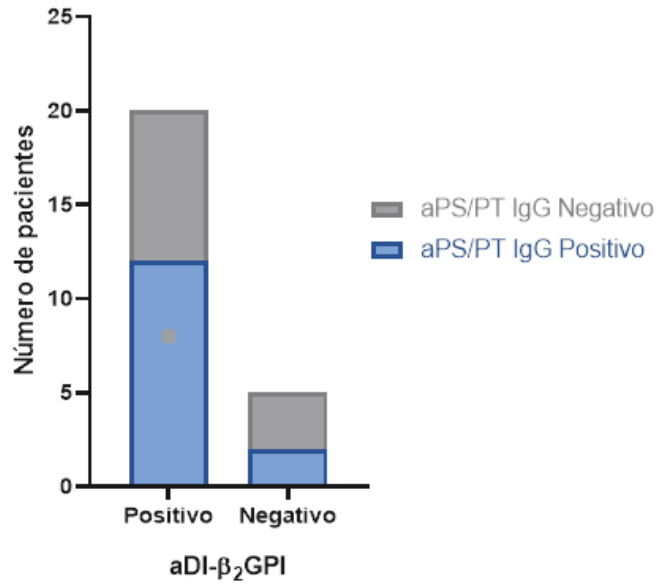


Figura 21. Relación entre los resultados de 25 pacientes para anticuerpos aPS/PT isotipo IgG y aDI-β<sub>2</sub>GPI detectados mediante ELISA.

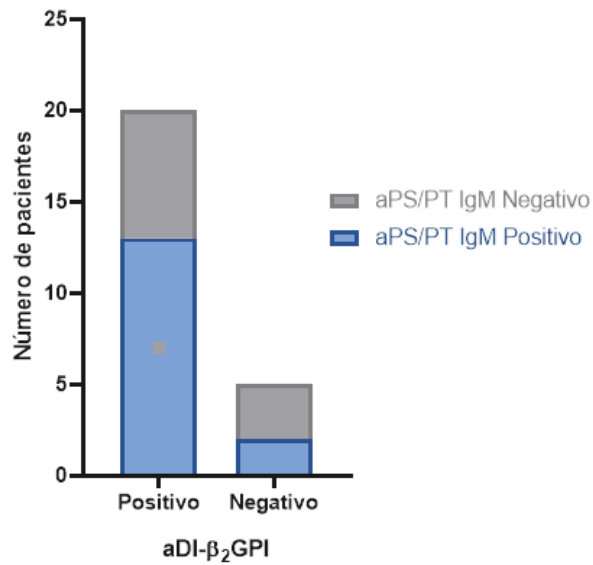


Figura 22. Relación entre los resultados de 25 pacientes para anticuerpos aPS/PT isotipo IgM y aDI-β<sub>2</sub>GPI detectados mediante ELISA.

Posteriormente, buscamos la relación entre dos o más anticuerpos con la presencia de trombosis, encontrando que 10 pacientes (83%) que tiene aDI-β<sub>2</sub>GPI y aβ<sub>2</sub>GPI positivo, 9 pacientes (81%) con aDI-β<sub>2</sub>GPI y aCL positivo, 12 pacientes (75%) con aDI-β<sub>2</sub>GPI y AL positivo, 11 pacientes (92%) con aDI-β<sub>2</sub>GPI y aPS/PT positivo, 9 pacientes (90%) con aDI-β<sub>2</sub>GPI, aβ<sub>2</sub>GPI, aCL y AL positivos, y 10 pacientes (100%) con aDI-β<sub>2</sub>GPI, aβ<sub>2</sub>GPI, aCL, AL y aPS/PT positivo presentaron al menos un evento trombotico (figura 23).

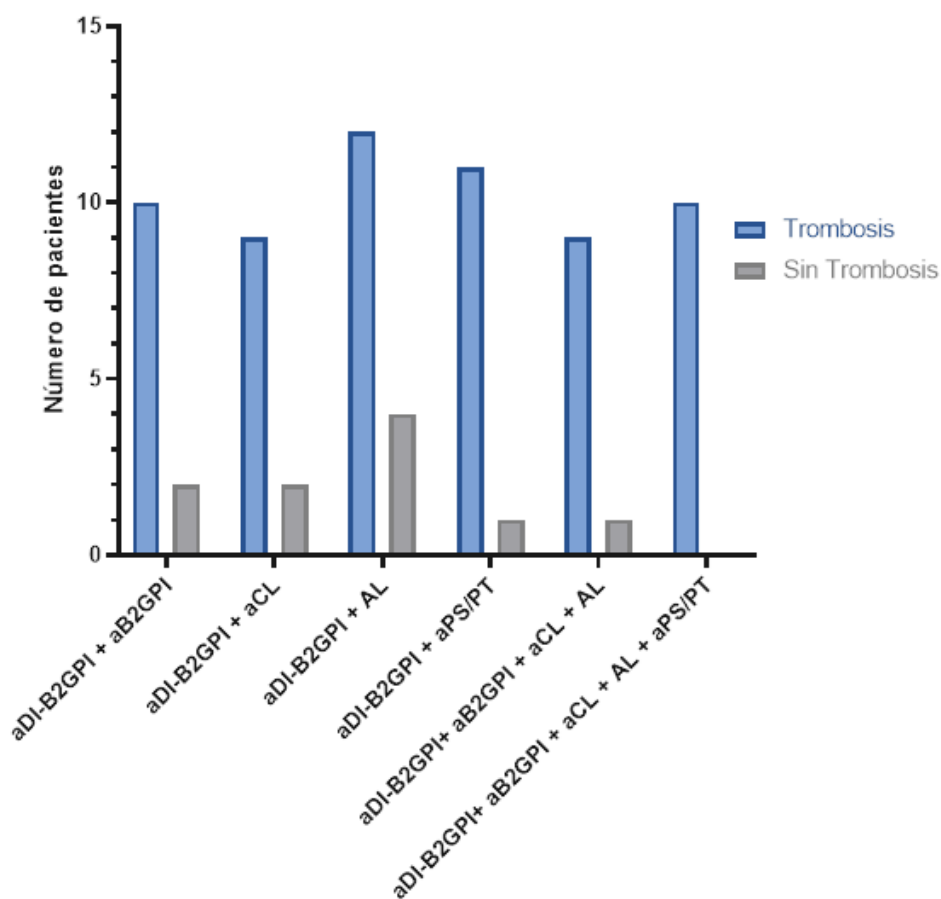


Figura 23. Relación entre los eventos tromboticos de pacientes con SAFP y sus resultados para diferentes anticuerpos antifosfolipidos en combinación con anticuerpos aDI-β<sub>2</sub>GPI detectados mediante ELISA.

## Discusión

En la última década los anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI han cobrado gran relevancia en el diagnóstico del SAF y se han sugerido que entren en los criterios del mismo <sup>33</sup> debido a que se ha observado su presencia en más de la mitad de los pacientes con SAF junto con estudios que demuestran su relación a eventos trombóticos de tipo venoso, los principales estudios que muestran esta relación son en poblaciones caucásicas, pero se desconoce su utilidad en otras poblaciones.<sup>22,33,41-42</sup>

Actualmente, existe un desafío en la estandarización de un método de detección para estos anticuerpos. Por ello, se han estado diseñando múltiples procedimientos caseros, si bien existe un método estandarizado de detección de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI por quimioluminiscencia (BIOFLASH), que es el kit comercial más confiable para la detección de los mismos. Sin embargo, es importante resaltar que el valor monetario de este método no siempre es rentable para los laboratorios, debido principalmente al costo del equipo, es por ello, importante estandarizar un ELISA casero que permita estudiar estos anticuerpos y conocer si tienen importancia clínica en la población mexicana.

Para diseñar el método, fue necesario partir desde la expresión. Se utilizaron cepas de HB-D1 que contienen el inserto para producir DI de la  $\beta_2$ -GPI. La expresión se realizó de acuerdo a lo establecido por *Colorado A.* permitiendo encontrar las condiciones óptimas para obtener un mejor rendimiento. Aunque después de la purificación por electroelución, se observó una disminución en la cantidad esperada,



posiblemente a que la una gran cantidad de proteína fue retenida en el gel. (Ver figura 9)

Una vez purificado el DI de la  $\beta_2$ -GPI, se comenzó con la estandarización del ELISA; mediante el uso de un tablero, que combina diferentes concentraciones del antígeno con distintas diluciones del anticuerpo para conocer las condiciones adecuadas de antígeno, dilución del anticuerpo, solución de bloqueo y tiempos de incubación.

Una vez establecida las condiciones (0.1 $\mu$ g/mL de antígeno con una dilución 1:100 de suero) se realizó el diseño de la curva de calibración utilizando el método de 4 parámetros (4PL), ya que por factores inherentes a los sueros no se recomienda utilizar otro tipo de curva. En la 4PL los parámetros que se miden son el punto mínimo, el punto máximo, el punto de inflexión y el coeficiente de la meseta permitiendo así generar un método cuantitativo.<sup>45,46</sup>

Para establecer el punto de corte (valor de referencia), se utilizó una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*, por sus siglas en ingles). Siendo esta curva la mejor para obtener los puntos de corte, ya que tiene los siguientes propósitos: determinar el punto de corte en donde se encuentra la mejor sensibilidad y especificidad clínica, es decir, da la capacidad para diferenciar entre sujetos sanos y enfermos, dando valores como escalas continuas.<sup>47</sup> Obteniendo un punto de corte de > 20.45 UA (sensibilidad 82.5% y especificidad 84.21%). Aunque hay que tomar en cuenta que el número de sujetos sanos fue menor a lo recomendado por las guías<sup>48,49</sup> donde se propone un número de 120 sujetos sanos, pero, debido a que

es necesaria una evaluación más exhaustiva para determinar si los sujetos están realmente sanos (tabla 2), por ello, se utilizó un número pequeño de muestra.

Después de determinar el punto de corte se evaluó el suero de pacientes que cumplieran los criterios para SAF, se encontró la presencia de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI en pacientes con SAFP mexicanos en contraste con los sujetos sanos ( $p < 0.0001$ ), observando este mismo resultado en otras poblaciones <sup>22,33,41</sup> que podría dar argumentos para su utilidad en los criterios para el diagnóstico de SAF.

Para corroborar la eficiencia y eficacia del método diseñado en el laboratorio, se correlacionaron los resultados de 24 pacientes con SAFP obtenidos mediante el ELISA casero y por los obtenidos por quimioluminiscencia, Se observó una discrepancia entre ambos métodos ( $R = -0.008705$ ). Hay que considerar que la sensibilidad alcanzada por el método de quimioluminiscencia es mayor al ELISA; sin embargo, este último es un método más rentable.

Posteriormente, no se encontró relación estadísticamente significativa relación entre los eventos trombóticos y la presencia de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI, como se descrito anteriormente en otras poblaciones <sup>22,33,41-42</sup>. Pese a este hallazgo y por la cantidad de pacientes en la cohorte, se puede observar una tendencia, puede indicar una relación con una trombosis de tipo venosa.

Como información adicional se revisó si existe relación entre otros anticuerpos característicos de SAF y los anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI. Se encontró que la presencia de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI es independiente a la presencia de aFL (anticuerpos a $\beta_2$ -

GPI IgG e IgM, aCL IgM, y, sin embargo, un punto importante es la cantidad de pacientes que se evaluaron, es por ello, necesario ampliar la cohorte se podría dar de manera más precisa las posibles relaciones entre ellos. Al buscar la relación con los aCL IgG, aPS/PT IgG e IgM, se encontró una posible relación, ya que presentaron una tendencia no significativa con estos anticuerpos, esto podría reforzar la teoría en la que el cambio conformacional de la  $\beta_2$ -GPI es la causal de la producción de autoanticuerpos en pacientes con SAF. Debido a que el epítipo crítico del DI, se encuentra protegido ya sea por el dominio V (forma circular) o por los carbohidratos del dominio III y IV (forma S) y una vez que se unen a un compuesto de carga negativa cambian su conformación a la forma J. <sup>1, 26,27,30-33</sup>

Se ha descrito la teoría de dobles, triples y hasta cuádruples positivos de aFL en SAF pueden pronosticar un evento trombótico, por lo que en 2012 se diseñó un método de puntaje con el mismo objetivo, demostrando que los anti-DI podrían añadirse a sus observaciones para mejorar la predicción de dichos eventos. <sup>13</sup>

Se observó en este estudio que al añadir la presencia de aDI- $\beta_2$ GPI a los aFL se puede pronosticar un evento trombótico, lo que refuerza la idea de ampliar una cohorte para encontrar la relación entre estos; es decir la adición de los anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI podría ayudar al pronóstico de pacientes con SAF, esto fue demostrado en 9 pacientes que poseían anticuerpos a $\beta_2$ -GPI, aCL, aPS/PT y aDI- $\beta_2$ GPI, todos presentaron un cuadro trombótico. es necesario recordar que anteriormente se ha identificado que poco tiempo antes de que ocurra la trombosis suelen bajar los títulos de anticuerpos en los pacientes, por lo que encontrar una relación estrecha entre el título y / o presencia de aFL podría dar un giro en el mecanismo por el cuál

atraviesa un paciente antes de presentar el cuadro clínico.<sup>6</sup> Por ello el estudio para diseño de nuevos métodos específicos permitirán un mejor diagnóstico y pronóstico para las enfermedades autoinmunes.

## **Conclusiones**

- Se estandarización y valido el ELISA para la detección de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI.
- Los pacientes con SAFP presentan títulos elevados de anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI.
- No se encontró correlación entre la técnica de ELISA casera para los anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI y la técnica por quimioluminiscencia para aDI- $\beta_2$ GPI (*Bioflash*).
- Los pacientes con anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI positivos presentan al menos un evento trombótico, principalmente trombosis venosa.
- No se encontró relación entre los anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI positivo con a $\beta_2$ GPI IgG, a $\beta_2$ GPI IgM, aCL IgM y AL.
- Existe una posible relación entre los pacientes con anticuerpos aDI- $\beta_2$ GPI y los aCL IgG, aPS/PT IgG e IgM.
- La presencia de dos o más anticuerpos puede condicionar la aparición de un evento trombótico.

## Referencias

1. Hernández-Ramírez D. ***El papel de la glicosilación de la  $\beta_2$ -Glicoproteína I ( $\beta_2$ GP-I) en el reconocimiento por los anti- $\beta_2$ GP-I ( $\alpha\beta_2$ GP-I) y su participación en la activación celular.*** Tesis doctoral, UNAM. 2015.
2. Alarcón-Segovia D. ***The antiphospholipid story.*** *J Rheumatol.* 2003; 30 (9): 1893-1896.
3. Pangborn MC. ***A new serologically active phospholipid from beef heart.*** *Procc Soc Exper Biol Med.* 1941; 48: 484-486.
4. Moore JE, Lutz WB. ***The natural history of systemic lupus erythematosus: an approach to its study through chronic biologic false positive reactors.*** *J Chron Dis.* 1955; 1 (3): 297-316.
5. Manoussakis MN, et al. ***High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population.*** *Clin Exp Immunol.* 1987; 69: 557-565.
6. Alarcón-Segovia D, et al. ***Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients.*** *Medicine (Baltimore).* 1989; 68 (6): 353-365.
7. Alarcón-Segovia D, et al. ***Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus.*** *Sem Arthritis Rheum.* 1992; 21 (5): 275-286.
8. Wendell A, et al. ***International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome.*** *Arthritis Rheum.* 1999; 42 (7): 1309-1311.

9. Miyakis S., et al. ***International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS).*** *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 295-306.
10. Mahler M., et al. ***Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein 1: A promising candidate biomarker for risk management in antiphospholipid syndrome.*** *Autoimmunity Rev.* 2012; 12 (2): 313-1317.
11. Passam FH, et al. ***Molecular pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: the role of oxidative post-translational modification of beta 2 glycoprotein I.*** *J Thromb Haemost.* 2011; 9 (suppl. 1): 275-282.
12. McDonnell T., et al. ***Antiphospholipid Antibodies to Domain I of Beta-2-Glycoprotein I Show Different Subclass Predominance in Comparison to Antibodies to Whole Beta-2-glycoprotein I.*** *Front Immunol.* 2018; 9 (2244): 1-7.
13. Otomo K., et al. ***Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events.*** *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (2): 504-512.
14. Tektonidou M. ***Antiphospholipid syndrome.*** *Orph encyclopedia.* 2004; 1-6.
15. Cervera R., et al. ***Antiphospholipid syndrome. Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients.*** *Arthritis Rheum.* 2002; 46 (4): 1019-1027.
16. Sherer Y, Shoenfeld Y. ***The Antiphospholipid syndrome.*** USA: Bio-Rad Lab; 2004
17. Giannakopoulos B., et al. ***The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome.*** *New Eng J Med.* 2013; 368 (11): 1033-1044.

18. Iverson GM., et al. ***The Orientation of B2GPI on the Plate is Important for the Binding of Anti-B2GPI Autoantibodies by ELISA.*** *J Autoimmunity.* 2002; 18 (4): 289-297.
19. Vianna JL., et al. **Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: A European multicenter study of 114 patients.** *Am J Med.* 1994; 96 (1): 3-9.
20. Schreiber K., et al. ***Antiphospholipid syndrome.*** *Nature Rev.* 2018; 4 (17103): 1-20.
21. Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. ***Mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolípidos.*** *Reum Clínica.* 2009; 7 (1): 72-76.
22. de Laat B, de Groot PG. ***Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I.*** *Curr Rheum Rep.* 2011; 13(1):70-6.
23. De Jong A, Ziboh V, Robbins D. ***Antiphospholipid antibodies and platelets.*** *Curr Rheum Rep.* 2000; 2 (3): 238-245.
24. de Laat B, Derksen RH, de Groot PG. ***B2-Glycoprotein I, the play marker of the antiphospholipid syndrome.*** *Clin Immunol.* 2004; 112 (2): 161-168.
25. Koike T. ***Antiphospholipid syndrome: 30 years and our contribution.*** *Int J Rheum Dis.* 2015; 18 (2): 233-241.
26. Lozier J, Takahashi N, Putnam F. ***Complete amino acid sequence of human plasma B2-glycoprotein I.*** *Procc Natl Acad Sci.* 1984; 81 (12): 3640-3644.
27. De Groot PG, Meijers JC. ***B2-Glycoprotein I: evolution, structure and function.*** *J thromb Haemos.* 2011; 9 (7): 1275-1284.

28. Krilis Sa, Sheng YH, Kandiah DA. ***The role of B2-glycoprotein I in the antiphospholipid syndrome.*** *Lupus.* 1996; 5 (2): 150-152
29. Schwarzenbacher R., et al. ***Crystal structure of human B2-Glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome.*** *EMBO J.* 1999; 18 (22): 6228-6239.
30. McNally T., et al. ***Immunoelectrophoresis and ELISA Techniques for assay of plasma B2-Glycoprotein-1 and the influence of plasma lipids.*** *Thromb Res.* 1993; 72 (4): 275-286.
31. Agar C, et al. ***Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome.*** *Blood.* 2010; 116 (8): 1336-1343.
32. Rull M., Alcocer J. **50 años del Departamento de Inmunología y Reumatología.** México: Permanyer; 2018.
33. Yin D, de Laat B, Devreese K, et al. ***The clinical value of assays detecting antibodies against domain I of B2-glycoprotein I in the antiphospholipid syndrome.*** *Autoimmun Rev.* 2018; 17 (12): 1210-1218.
34. Buttari B, Profumo E, Capozzi A, et al. ***Post-translational modifications of proteins in antiphospholipid syndrome.*** *Critl Rev Clin Lab Sci.* 2019; 56 (8): 511-525.
35. Miyakis S, Robertson S, Krilis S. ***Beta-2 glycoprotein I and its role in antiphospholipid syndrome: lessons from knockout mice.*** *Clin Immunol.* 2004; 112 (2):136-143.
36. Agar C, de Groot PG, Mörgelin M, et al. ***B2-Glycoprotein I: a novel component of innate immunity.*** *Blood.* 2011; 117 (25): 6939-6947



37. Matsuura E, et al. ***Heterogeneity of aCL defined by cardiolipin factor.*** *J Immunol.* 1992; 148 (12): 3885-3891.
38. Serrano M, et al. ***The IgA isotype of Anti-B2 glycoprotein I antibodies recognizes epitopes in domain 3, 4, and 5 that are located in a lateral zone of the molecule (L-Shaped).*** *Front Immunol.* 2019; 10 (1031): 1-13.
39. de Laat B, et al. ***Pathogenic anti-B2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of B2-glycoprotein I only after a conformational change.*** *Blood.* 2006; 107 (5): 1916-1924.
40. de Laat B, Pengo V, Pabringer I, et al. ***The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study.*** *J Thromb Haemost.* 2009; 7 (11): 1767-1773.
41. de Laat B, et al. ***IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of B2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis.*** *Blood.* 2005; 105 (4): 1540-1545.
42. Tonello M, et al. ***Clinical value of anti-domain I-B2Glycoprotein1 antibodies in antiphospholipid antibody carriers. A single centre, prospective observational follow-up study.*** *Clin Chim Acta.* 2018; 485: 74-78.
43. Sciascia S, et al. ***Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review.*** *Thromb Haemost.* 2014;111 (2):354-364.

44. Colorado A. ***Producción recombinante y caracterización fisicoquímica de la escorpina***. UNAM. 2019.
45. Hyowon A, et. al. ***Dr4pl: A Stable Convergence Algorithm for the 4 Parameter Logistic Model***. *R Journal*. 2019; 11(2):171-190.
46. ***Four parameter logistic (4PL) curve calculator*** [Internet]. Aatbio.com. [citado el 21 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.aatbio.com/tools/four-parameter-logistic-4pl-curve-regression-online-calculator>
47. Altman DG, et. al. ***Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots***. *BMJ*. 1994; 309(6948):188.
48. Horowitz G, et. al. ***CLSI Document EP28-A3c:2008 Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. 3rd ed.*** Wayne, PA: CLSI; 2008.
49. Hallworth MJ, et al. ***Current evidence and future perspectives on the effective practice of patient-centered laboratory medicine***. *Clin Chem*. 2015;61(4):589-599.